



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
Ano 2010

**SANDRA ISABEL  
FIDALGO DOS  
SANTOS**

## **DESENVOLVIMENTO DE UM AZEITE COM AROMA A LIMÃO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à Matilde Fidalgo dos Santos Leite.

## **O Júri**

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (Presidente do Júri)  
Investigador Auxiliar – Departamento de Química – Universidade de Aveiro

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivonne Delgadillo Giraldo (Orientadora)  
Professora Associada com Agregação – Departamento de Química –  
Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria Almeida Cardoso  
Investigadora Auxiliar – CERNAS – Escola Superior Agrária de Coimbra –  
Instituto Politécnico de Coimbra

Doutora Carla Alexandra Nunes (Co-Orientadora)  
Pós-Doutoranda – Departamento de Química – Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Desejo agradecer à minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Ivonne Delgadillo, por todo o entusiasmo e acreditação nesta ideia de desenvolvimento.

Um agradecimento muito especial à minha co-orientadora Professora Alexandra Nunes, por toda a arquitectura, disponibilidade, orientação e colaboração em todo o trabalho realizado.

Ao Mickael Santos, por toda a disponibilidade e orientação na utilização da Alta Pressão.

Ao Doutor Jorge Saraiva, pela orientação inovadora que deu a esta ideia de desenvolvimento.

A todos os elementos do departamento de Química (grupo de Bioquímica e Química Alimentar)

À Dra. Dulce Helena, pela simpatia e atenção prestada.

## Palavras-Chave

Azeite, limoneno, SPME, pressão atmosférica, alta pressão, índice de acidez, índice de peróxidos.

## Resumo

Foram preparadas amostras de azeite aromatizadas com casca de limão, uma com 10,5g/kg à qual foram retiradas as cascas após 7 dias e outra com 5g/kg onde a casca permaneceu ao longo do estudo, tendo a sua estabilidade sido acompanhada ao longo de 60 dias. Verificou-se que o índice de acidez de ambas as amostras se manteve estável ao longo de todo o estudo, no entanto o índice de peróxidos sofreu variação ao longo do tempo atingindo, no final do estudo, valores acima dos regulamentados para este parâmetro (20meq.O<sub>2</sub>/kg). A quantidade de limoneno extraída da casca de limão para o azeite, revela valores sem oscilações significativas, não havendo portanto perdas ao longo do tempo. A PCA (Análise de Componentes Principais) aplicada aos espectros de FTIR permitiu classificar o azeite aromatizado ao longo do tempo mostrando uma separação entre azeites com valores de índice de peróxido inferior e superior a 20meq.O<sub>2</sub>/kg).

A utilização da Alta Pressão (AP) na extracção de limoneno, permitiu concluir que as amostras pressurizadas apresentam um teor de limoneno mais elevado do que as aromatizadas à pressão atmosférica. Os valores de extracção mais elevados ( $\pm 30\mu\text{g/kg}$ ) foram obtidos a 100 MPa durante 15 minutos, tendo-se obtido, com estas condições experimentais, quase o dobro da quantidade de limoneno extraída à pressão atmosférica.

Procedeu-se ainda à extracção do azeite recorrendo a AP reduzindo a quantidade de azeite envolvida (pressurização em saco). Os resultados obtidos com frasco, concluindo-se que existe similaridade no que diz respeito à quantidade de limoneno extraída. Nas mesmas condições, foi realizado um ensaio que permitiu avaliar a quantidade de casca de limão a partir da qual, mantendo-se a quantidade de azeite, se atinge o equilíbrio de extracção, o que em termos industriais permitirá a diminuição de custos inerentes à redução de matéria-prima.

Verificou-se que os valores determinados para o índice de acidez e índice de peróxidos do azeite submetido a AP, encontram-se dentro dos valores regulamentados para esses parâmetros químicos, mesmo após os 30 dias.

Sugere-se ainda, como alternativa industrial à aromatização de azeite com casca de limão, a preparação de uma amostra de azeite intensamente aromatizado com limoneno de casca de limão, podendo ser usada em diluições, ajustando-se a quantidade de limoneno desejada e sem que o azeite necessite de estar em contacto com as cascas de limão.

## Keywords

Olive Oil, SPME, Atmospheric Pressure, High Pressure, Acidity Index, Peroxid Index

## Abstract

Was performed flavoring of olive oil with citric peel, with 10,5g/kg, that we retired the peel after 7 days and another with 5g/kg, that stay with peel throughout the study, and the stability has been accompanied for approximately 60 days. It was investigated that both samples acidity was kept stable throughout the study, however peroxid level varies along the time, and in the end of the investigation it is above to the allowed (20meq.O<sub>2</sub>/kg). Limonene quantity extracted doesn't show any significant variations, and obviously no losses over the time. PCA (Principal Component Analysis) applied to FTIR spectra allowed peel lemon with fragrance olive to be classified along the time, and clear results differentiation could be visualized between olive oils with values lower and above to 20meq.O<sub>2</sub>/kg.

(HP) High Pressure use in limonene extraction allowed conclusions such as : pressurized samples present a higher limonene content comparing to samples flavored at atmospheric pressure. Extraction results higher ( $\pm 30\mu\text{g/kg}$ ) were obtained to 100 MPa for 15 minutes, being almost double of atmospheric pressure extracted quantity taken.

To complement the investigation, AP extraction was performed, reducing olive oil quantities involved (bag pressurization). Comparing results it is concluded that there is a similar, to the amount of limonene extracted. A trial was performed in the same conditions, where lemon peel could be analysed keeping. Keeping the same olive oil quantity extraction equilibrium is achieved, which allows to minimize raw material costs.

Acidity index results and peroxid index submitted to AP are under the legislation, even after 30 days.

Lemon peel intense flavoring oil with limonene is suggested as alternative to industrialized lemon peel olive fragrance. It can be used in dilutions adjusting required limonene amount, and through this method olive don't need to be in contact with peels.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
DESIGNAÇÕES ANGLO-SAXÓNICAS.....	XIII
<b>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- PROCESSO DE EXTRACÇÃO DO AZEITE .....	2
3- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE .....	3
3.1- Fracção Saponificável .....	4
3.2- Fracção Insaponificável.....	5
4- CLASSIFICAÇÃO DO AZEITE.....	7
4.1- Azeites DOP .....	8
4.2- Azeites Biológicos e de Quinta.....	9
5- OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS E FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO AZEITE .....	10
5.1- Peroxidação Lipídica .....	10
5.2- Oxidação Enzimática.....	11
5.3- Factores Externos que Influenciam a Oxidação do Azeite.....	12
6- ANÁLISE DA QUALIDADE DO AZEITE .....	13
6.1- Métodos de Análise Química.....	13
6.2- Análise Sensorial .....	14
6.3- Análise de Compostos Voláteis em Azeite por Microextracção em Fase Sólida (SPME) .....	16
6.4- Análise de Espectros de Infravermelho .....	18
7- DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS COM BASE EM AZEITE.....	21
7.1- Aroma de Limão.....	22
8- PROCESSO DE EXTRACÇÃO POR ALTA PRESSÃO .....	24
9- OBJECTIVOS.....	26
<b>CAPÍTULO II – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....</b>	<b>27</b>
1- CARACTERÍSTICAS DO AZEITE .....	27
2- PROCEDIMENTO COM CASCA DE LIMÃO.....	27

<b>3- AMOSTRAS DE AZEITES AROMATIZADOS COM TANGERINA, LARANJA E LIMÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>4- CARACTERÍSTICAS DO COMPOSTO PADRÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>5- ENSAIO DE AZEITES AROMATIZADOS COM CASCA DE LIMÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6- ENSAIOS DE EXTRACÇÃO À PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....</b>	<b>30</b>
<b>7- ENSAIOS DE EXTRACÇÃO À ALTA PRESSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO III – METODOLOGIA APLICADA.....</b>	<b>33</b>
<b>1- ÍNDICE DE ACIDEZ.....</b>	<b>33</b>
<b>2- ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3- FTIR.....</b>	<b>34</b>
<b>4- NIR .....</b>	<b>35</b>
<b>5- SPME .....</b>	<b>36</b>
<b>6- GC-FID .....</b>	<b>37</b>
<b>7- ALTA PRESSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>8- ANÁLISE MULTIVARIADA .....</b>	<b>39</b>
<b>IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>1- AZEITES AROMATIZADOS COM TANGERINA, LARANJA E LIMÃO .....</b>	<b>41</b>
1.1-Análise Multivariada .....	41
1.2- Índice de Acidez.....	42
1.3- Índice de Peróxidos.....	44
<b>3- CURVA DE CALIBRAÇÃO DO LIMONENO .....</b>	<b>47</b>
<b>4- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO AZEITE AO LONGO DO TEMPO.....</b>	<b>48</b>
4.1- Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	48
4.2- Azeite Aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	55
<b>5- ESTUDO DA EXTRACÇÃO DO LIMONENO PARA O AZEITE À PRESSÃO ATMOSFÉRICA.....</b>	<b>61</b>
<b>6- UTILIZAÇÃO DA ALTA PRESSÃO NA EXTRACÇÃO DE LIMONENO .....</b>	<b>62</b>
6.1- Utilização da AP na Extracção com Saco.....	64
6.2- Variação da Concentração de Limoneno com a Quantidade de Casca de Limão	66
6.3- Índice de Acidez.....	68
6.4- Índice de Peróxidos.....	69



<b>7- AZEITE INTENSAMENTE AROMATIZADO COM LIMONENO DA CASCA DE LIMÃO</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do ácido oleico.....	5
Figura 2 - Diagrama da peroxidação lipídica .....	11
Figura 3- Estrutura de monohidroperóxidos .....	12
Figura 4 - Fase de Dessorção .....	17
Figura 5 - Fotografia da agulha utilizada em todo o processo de SPME .....	18
Figura 6- Espectro de FTIR-ATR de um azeite com indicação das regiões que contém absorvâncias de grupos funcionais específicos.....	19
Figura 7- Espectro de NIR característico de um azeite .....	20
Figura 8- Estrutura do Limoneno 3D .....	23
Figura 9- Estrutura do Limoneno.....	24
Figura 10 - Espectrómetro de Infravermelho de Fourier .....	35
Figura 11- Placa de aquecimento, fase de adsorção.....	36
Figura 12- Cromatógrafo utilizado para a realização dos ensaios com a agulha .....	37
Figura 13- Equipamento de Alta Pressão .....	39
Figura 14- Coordenadas factoriais da primeira componente principal para os dados do NIR .....	42
Figura 15- Índice de acidez para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão..	43
Figura 16- Índice de peróxidos para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão .....	45
Figura 17- Curva de calibração obtida para o limoneno .....	47
Figura 18- Índice de Acidez do Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	49
Figura 19- Índice de Peróxidos do Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	51
Figura 20- Concentração de limoneno na fase volátil do azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	52
Figura 21- Coordenadas factoriais relacionando a primeira com a segunda componente principal, para os dados do FTIR .....	53
Figura 22- Contribuições factoriais da primeira e da segunda componente principal, para os dados do FTIR.....	54
Figura 23- Índice de Acidez do Azeite Aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	56
Figura 24- Índice de Peróxidos do Azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	57

Figura 25- Concentração de limoneno na fase volátil do azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias .....	59
Figura 26- Coordenadas factoriais relacionando a primeira com a segunda componente principal, para os dados do FTIR .....	60
Figura 27- Contribuições factoriais da primeira e da segunda componente principal, para os dados do FTIR.....	60
Figura 28- Curva de extracção de limoneno à pressão atmosférica .....	61
Figura 29- Concentração de limoneno presente em amostras de azeite pressurizadas a 100, 200 e 300MPa, durante 5 e 15 minutos.....	63
Figura 30- Concentração de limoneno presente em amostras de azeite, em saco comparativamente ao frasco .....	65
Figura 31- Concentração de limoneno por quantidade de casca de limão, a 100 MPa, durante 15 minutos, em saco .....	67
Figura 32- Índice de Acidez para amostra de azeite aromatizado, sujeito a pressurização .....	68
Figura 33- Índice de Peróxidos para amostra de azeite aromatizado, sujeito a pressurização.....	70

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades Físicas do Limoneno .....	24
Tabela 2- Parâmetros de qualidade do azeite utilizado nos ensaios, de acordo com o rótulo.....	27
Tabela 3- Amostras que foram analisadas por NIR.....	28
Tabela 4- Diluições para determinação de pontos para a curva de calibração do limoneno .....	29
Tabela 5- Características do equipamento onde foram realizados os ensaios de AP.....	38
Tabela 6- Resultados de determinações de índice de acidez, para os azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão .....	43
Tabela 7- Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão .....	44
Tabela 8- Resultados de determinações de índice de acidez, para azeites aromatizados com 10,5g/kg de casca de limão .....	49
Tabela 9- Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com 10,5g/kg de casca de limão.....	50
Tabela 10- Resultados da determinação da área de pico de limoneno .....	52
Tabela 11- Resultados de determinações de índice de acidez, para azeites aromatizados com 5g/kg de casca de limão.....	55
Tabela 12- Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com 5g/kg de casca de limão.....	57
Tabela 13- Resultados da determinação da área de pico de limoneno .....	58
Tabela 14- Resultados das áreas de pico de limoneno pressurizadas a 100, 200 e 300 MPa, durante 5 e 15 minutos .....	63
Tabela 15- Resultados das áreas de pico de limoneno pressurizadas a 100 MPa, durante 15 minutos, em saco comparativamente ao frasco.....	65
Tabela 16- Concentração de limoneno por quantidade de casca de limão para 5 ml de azeite .....	66
Tabela 17- Resultados das determinações do índice de acidez para um azeite submetido a AP (100MPa, durante 15 minutos) .....	68
Tabela 18- Resultados das determinações do índice de peróxidos para um azeite submetido a AP (100MPa, durante 15 minutos).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

**PCA-** Análise em componentes principais

**AP-** Alta pressão

**ATR-** Reflectância total atenuada

**COI-** Conselho Oleícola Internacional

**DOP-** Denominação de origem protegida

**FID-** detector de ionização por chama

**FTIR-** Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier

**GC-** Cromatografia gasosa

**GC-FID-** Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama

**IGP-** Indicações geográficas protegidas

**IV-** Infravermelho

**IA-** Índice de Acidez

**IP-** Índice de Peróxidos

**NIR-** Infravermelho próximo

**MIR-** Infravermelho médio

**PDMS-** Polydimetilsiloxane

**PUFA-** Ácidos gordos polinsaturados

**SPME-** Microextração em fase sólida

## DESIGNAÇÕES ANGLO-SAXÓNICAS

**Splitless-** termo usado para designar a ausência do fluxo gasoso, durante a injeção num sistema de cromatografia gasosa.

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1- INTRODUÇÃO

Nos países mediterrâneos o azeite tem, além da importância nutricional, um grande valor sócio-cultural e económico. A sua produção constitui, em várias regiões desfavorecidas, o principal suporte da actividade económica, pelo que qualquer evolução no sector olivícola está associado a efeitos positivos na estrutura sócio-económica (Cunha, 2007).

O consumo significativo de azeite está relacionado com os benefícios para a saúde e as características organolépticas que advêm da sua composição, sendo estas as principais responsáveis pela qualidade do azeite. Contém elementos nutricionais importantes, tais como vitaminas e antioxidantes, mas é composto sobretudo por triacilgliceróis (~99%), ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis, hidrocarbonetos, esteróis, álcoois alifáticos, tocoferóis, pigmentos, bem como outros compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis (Custódio, 2009).

O sector olivícola em Portugal possui grande importância sócio-económica, particularmente nas regiões do Alentejo e de Trás-os-Montes, sendo as maiores produtoras de azeitona para azeite. A recente aposta de algumas cooperativas em avanços tecnológicos nos processos de transformação e de embalamento do azeite, bem como mudanças estruturais na instalação e cultura do olival, aliadas à criação da Denominação de Origem Protegida (DOP) para azeites de determinadas regiões, constituem uma evolução positiva para o sector.

Devido à mudança da legislação introduzida no sector e com base na necessidade de inovação sentida, o mercado do azeite tem vindo a sofrer alterações, nomeadamente na forma de apresentação dos produtos.

O segmento de azeites de especialidade é um nicho de mercado que, começa a ter alguma relevância na classificação do azeite, pois inclui azeites seleccionados com embalagens mais atractivas e adição de outros componentes. Aromatizar o azeite é uma das especialidades que invocam inovação no sector. Em termos industriais já existe uma

vasta gama de azeites aromatizados com ervas, alho, cebola, cogumelos, citrinos entre outros. Estes novos azeites exigem técnicas de linha de produção, sofisticadas para monitorizar processos e avaliar a sua composição e qualidade.

Neste trabalho, pretende-se aromatizar azeite com citrinos, recorrendo à adição directa de cascas ao azeite, em pressão atmosférica e à Alta Pressão (AP). A análise do azeite aromatizado incluiu a microextração em fase sólida (SPME) para a identificação e quantificação do limoneno por cromatografia gasosa (GC-FID), aquisição de espectros de infravermelho próximo (NIR) e médio (FTIR) e métodos químicos para determinação de índice de acidez e de peróxidos.

## 2- PROCESSO DE EXTRACÇÃO DO AZEITE

Previamente ao processo de extracção do azeite, a azeitona é sujeita a várias fases de transformação, as quais poderão ser determinantes para o produto final, pois há que ter em consideração, que para a produção de um azeite de qualidade, o fruto deve ser trabalhado nas 24 horas seguintes à sua apanha (Ferraz, 2009; Martins, 2005 e Travassos, 2009).

A azeitona, após colhida é levada para o lagar onde será peneirada, depois é lavada com água fria, a fim de se eliminar qualquer impureza ou corpo estranho e de seguida recolhe-se uma amostra para análise laboratorial, realizando-se por fim a pesagem (Ferraz, 2009; Martins, 2005 e Travassos, 2009).

A moenda é feita por moinho de martelos e consiste na trituração da azeitona até formar uma pasta. Este grau de trituração ou moagem é ajustado de acordo com o estado de maturação da azeitona. Esta massa de azeitona é batida e aquecida simultaneamente numa termobatedeira durante, aproximadamente, 45 minutos, a uma temperatura que deverá ser inferior a 30°C (Custódio, 2009 e Roque *et al.*, 2008).

Após esta fase, procede-se à extracção propriamente dita, ou seja, à separação da fase sólida (o bagaço), das fases líquidas (azeite e águas de vegetação) (Travassos, 2009).

Esta operação é realizada por sistemas de pressão ou centrifugação (Pinto, 2003).

No sistema de pressão, clássico ou descontínuo, a massa coloca-se entre os capachos e submete-se a pressão para separar o mosto oleoso, que posteriormente se deixa decantar para obter por diferença de densidade o azeite (Martins, 2005 e Pinto, 2003).

No sistema por centrifugação ou contínuo de três fases, à pasta de azeitona batida adiciona-se água e faz-se passar por uma centrifugadora horizontal onde é separada a parte sólida do mosto oleoso. Este passa, depois por uma centrifugadora vertical, onde há a separação do azeite da água de vegetação (Martins, 2005; Pinto, 2003 e Roque *et al.*, 2008).

O sistema por centrifugação ou contínuo de duas fases é praticamente igual ao anterior, com a diferença, que em vez de se adicionar água à massa, a água existente sai conjuntamente com a fase sólida. Desta forma, este sistema tem a vantagem de produzir azeites com maior teor em antioxidantes naturais (polifenóis) (Martins, 2005; Pinto, 2003 e Roque *et al.*, 2008). Este é o sistema mais utilizado.

O azeite é filtrado e armazenado em recipientes, entre 15 e 16°C, para a decantação dos sólidos, resultantes do processo de extração e por fim é embalado em garrafas de vidro, escuro, entre 18 e 20°C (Custódio, 2009 e Ferraz, 2009).

### 3- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

Do ponto de vista químico, os componentes do azeite podem dividir-se em duas fracções: uma saponificável (fracção que permite a formação de sabões, sais de sódio e/ou potássio, por hidrólise em meio alcalino) e outra insaponificável (Cunha, 2007).

A primeira fracção constitui cerca de 97 e 99% do peso total do azeite, constituída maioritariamente por triacilgliceróis, uma pequena fracção de di e mono gliceróis e de ácidos gordos livres (Cunha, 2007 e Luchetti, 2002). A composição em ácidos gordos do azeite pode variar de acordo com a variedade da azeitona, condições climáticas e local de produção (Luchetti, 2002).



A fracção insaponificável integra um conjunto muito variado de substâncias: álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, fitosteróis e tocoferóis. Embora constituam a fracção minoritária do azeite, a presença destas substâncias é de elevada importância, tanto do ponto de vista nutricional como da estabilidade e da qualidade organoléptica do produto (Cunha, 2007).

### 3.1- Fracção Saponificável

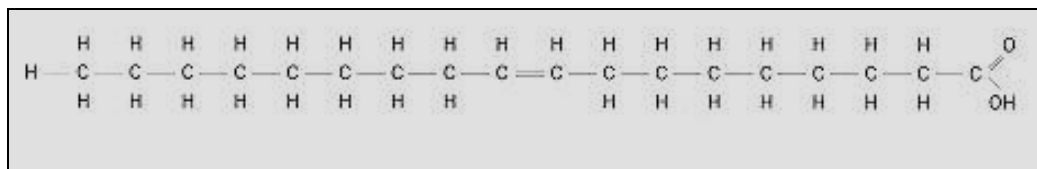
A composição em ácidos gordos é um dos parâmetros mais utilizados no controlo de qualidade de azeites (Cunha, 2007). Os ácidos gordos são estruturalmente formados por uma cadeia hidrocarbonada com um grupo carboxílico numa das extremidades.

Segundo Luchetti (2002), a composição de ácidos gordos do azeite varia de acordo com a variedade, condições climáticas e local de produção e estão distribuídos em termos do número de duplas ligações, da seguinte forma (em média):

- 14% Ácidos gordos saturados
- 72% Ácidos gordos monoinsaturados
- 14% Ácidos gordos polinsaturados

No azeite, o ácido gordo maioritário é o ácido oleico (C18:1 $\Delta^9$ ) (Figura 1), que representa entre 53 e 83% dos ácidos gordos totais (Cunha, 2007 e Luchetti (2002). Segundo Cunha (2007), seguem-se-lhe os ácidos gordos saturados, que representam entre 13 e 21% dos ácidos gordos totais. Destes o mais representativo é o ácido palmítico (C16:0) cuja presença no azeite varia entre 7,5 e 20% do teor total de ácidos gordos. Em menor proporção encontra-se o ácido esteárico (C18:0), com valores que oscilam entre 0,5 e 5% dos ácidos gordos totais. Por último, as quantidades mais baixas de ácidos gordos saturados correspondem aos ácidos araquídico (C20:0) e behénico (C22:0) com um máximo de 0,8%, ao ácido heptadecanóico (C17:0) com valores até 0,5%, ao ácido mirístico (C14:0) e ao ácido lignocérico (C24:0) com um máximo de 0,1%. No que se refere aos ácidos gordos polinsaturados, estes são representados

principalmente pelo ácido linoleico ( $C_{18}:2\Delta^{9,12}$ ), que representa entre 3,5 e 21% dos ácidos gordos totais e pelo ácido linolénico ( $C_{18}:3\Delta^3$ ) com um máximo de 1,5%.



**Figura 1-** Estrutura do ácido oleico

**Fonte:** [www.dq.fct.unl.pt/qoa/abn1/2002/oleico/NET.htm](http://www.dq.fct.unl.pt/qoa/abn1/2002/oleico/NET.htm) (2002)

### Ceras

As ceras são ésteres de álcoois gordos com ácidos gordos e o seu teor nos azeites não ultrapassa 350  $\mu\text{g/g}$ , é habitual serem caracterizadas pelo número total de carbonos ( $C_{36}$ ,  $C_{38}$ ,  $C_{40}$ ,  $C_{42}$ ,  $C_{44}$  e  $C_{46}$ ).

### 3.2- Fracção Insaponificável

Esta fracção, segundo Cunha (2007), pode dividir-se em dois grupos: um inclui as substâncias provenientes de ésteres que não os ácidos gordos, como por exemplo: os álcoois das ceras, os esteróis esterificados e os componentes dos fosfolípidos, derivados dos ácidos gordos, como os 4-desmetilesteróis desesterificados, o outro grupo inclui substâncias não relacionadas quimicamente com os ácidos gordos, como os hidrocarbonetos, álcoois alifáticos, fitosteróis, tocoferóis, carotenóides, clorofilas e compostos fenólicos.

### Álcoois alifáticos e diterpénicos

O teor de álcoois alifáticos nos azeites, é semelhante ao das ceras, não ultrapassa 350 µg/g e são: docosanol, tetracosanol, hexacosanol e octacosanol.

Os álcoois diterpénicos mais abundantes nos azeites são o fitol e o geranilgeraniol (Cunha, 2007).

### Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos constituem 32-50% da fracção insaponificável do azeite. O principal hidrocarboneto é o esqualeno, formado por 30 carbonos (Cunha, 2007).

### Clorofilas e carotenóides

As clorofilas: *a* e *b* e as feofitinas: *a* e *b* são responsáveis pela cor do azeite, os seus teores variam entre 1 e 20 µg/g. A feofitina *a* é o pigmento natural predominante representando entre 70 e 80% do total destes compostos.

Os principais carotenóides dos azeites são a luteína e o β-caroteno. O teor destes compostos depende de diversos factores como as características ecológicas da cultura e o manuseamento da azeitona, desde a apanha até à obtenção do azeite (Cunha, 2007).

### Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos contribuem para a avaliação das características organolépticas e do tempo de prateleira de um azeite (Martins, 2005). O azeite pode conter entre 50 e 800 mg/kg de polifenóis totais expressos em ácido cafeico. A sua concentração varia em função da variedade, o estado de maturação e os processos de elaboração, já que são substâncias hidrossolúveis que se perdem com facilidade (Cunha, 2007).

### Fitosteróis

O teor de fitosteróis no azeite constitui uma ferramenta útil na avaliação da qualidade e da autenticidade. Os principais fitosteróis nos azeites são o β-sitosterol, o Δ<sup>5</sup>-

avenasterol e o campesterol, com respectivamente entre, 75 e 90%, 5 e 20% e 1 e 4% da fracção total dos esteróis presentes no azeite.

### **Tocoferóis e tocotrienóis**

Os tocoferóis têm um papel biológico importante como antioxidantes, contribuindo para a estabilidade do azeite. Os tocoferóis juntamente com os tocotrienóis constituem um grupo de substâncias designadas por vitamina E e derivam do 2-metil-6-cromanol. Os tocotrienóis distinguem-se dos tocoferóis pela presença de três insaturações na cadeia lateral, nomeadamente nas posições 2', 4' e 8', sendo por isso possível a ocorrência de 8 estereoisómeros, existindo 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, ambos designados por  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -, diferenciando entre si pelo número e posição de grupos metilo no anel aromático. No azeite,  $\alpha$ - tocoferol representa entre 90 e 95% do teor dos tocoferóis totais.

## **4- CLASSIFICAÇÃO DO AZEITE**

A União Europeia reconhece várias categorias de azeite, cada uma com as suas características e valores de mercado próprios e segundo o Reg. N° 2568/91 da Comissão Europeia, a classificação do azeite é feita, usando uma árvore de decisão, com base na percentagem de acidez, no índice de peróxidos, nas absorvâncias no ultravioleta e na análise sensorial.

O azeite virgem é obtido exclusivamente a partir de azeitonas que foram sujeitas a meios mecânicos e físicos (operações tecnológicas), sob condições térmicas que não impliquem alterações, podendo estas serem: lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Com estas características este azeite está destinado ao consumo humano e pode ser dividido em quatro categorias (Reg. N° 2568/91 e Vossen, 2007).

- **Azeite virgem extra:** azeite virgem com gosto perfeitamente irrepreensível, que reflecte o fruto do qual foi feito, com acidez, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8%. É avaliado por um painel de provadores treinados e possui zero

defeitos e atributos positivos. Variedade, maturidade do fruto, região geográfica e técnica de extracção podem ser diferentes para este tipo de azeite;

- Azeite virgem: azeite virgem com gosto perfeitamente irrepreensível, com acidez, expressa em ácido oleico, não superior a 2%. Este azeite possui índices analíticos e sensoriais, ligeiramente abaixo do azeite virgem extra;
- Azeite virgem corrente: azeite virgem com gosto bom, com acidez, expressa em ácido oleico, não superior a 3,3%;
- Azeite virgem lampante: azeite virgem com gosto defeituoso ou com acidez, expressa em ácido oleico, superior a 3,3%.

Destes apenas o azeite virgem lampante não pode ser comercializado directamente, deve ser refinado previamente (Vossen, 2007).

A denominação de azeite passa por uma mistura de azeite refinado com azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, cuja acidez, expressa em ácido oleico, não seja superior a 1,5%. O azeite refinado é obtido pela refinação de azeite virgem e tem uma acidez, expressa em ácido oleico, não superior a 0,5% (Reg. Nº 2568/91). Os azeites virgem e virgem extra podem fazer parte de uma denominação de origem protegida (DOP), podendo ser de agricultura biológica ou de quinta (Custódio, 2009).

### 4.1- Azeites DOP

Um azeite de denominação de origem protegida (DOP) é um produto produzido de acordo com regras pré-estabelecidas, as quais incluem variedades de azeitonas, condições de apanha e de transporte e extracção de azeite, de forma a assegurar a sua especificidade e qualidade, com características químicas e sensoriais únicas (Custódio, 2009, MADRP, 2001 e Oliveira, 2009).

A certificação de um azeite DOP é obtida após recolha de amostras e visitas de controlo ao local da entidade certificadora. A única entidade em Portugal reconhecida pela UE para análises químicas e organolépticas é o ISA (Instituto Superior de Agronomia) (MADRP; 2001 e Oliveira, 2009).

Um azeite de indicações geográficas protegidas (IGP) é igualmente um produto certificado protegido a nível Europeu, sendo no entanto, a sua ligação à região demarcada mais abrangente. O caderno de especificações associado ao produtor permite uma maior flexibilidade em relação às Denominações de Origem Protegida (MADRP, 2001).

O reconhecimento de um produto como DOP ou IGP é concedido a título provisório a nível nacional, pelo Estado do país de origem e a título definitivo e a nível europeu pela Comunidade Europeia (MADRP, 2001 e Oliveira, 2009).

Em Portugal existem seis Denominações de Origem Protegidas para Azeites: Azeites de Moura, Azeites do Norte Alentejano, Azeites de Trás-os-Montes, Azeites do Ribatejo, Azeites da Beira Interior e Azeites do Alentejo Interior. Esta última Denominação ainda não se encontra em funcionamento (MADRP, 2001).

### **4.2- Azeites Biológicos e de Quinta**

O azeite biológico é proveniente da Agricultura Biológica, não sendo utilizados adubos ou pesticidas no manejo do olival e na obtenção da azeitona. Em todo o processo de extracção é igualmente interdito o uso de substâncias químicas sintéticas. Estes azeites estão normalmente associados a uma região geográfica ou a um modo particular de produção e pressupõe certificação e controlo desde o olival até ao lagar (Custódio, 2009 e Oliveira, 2009).

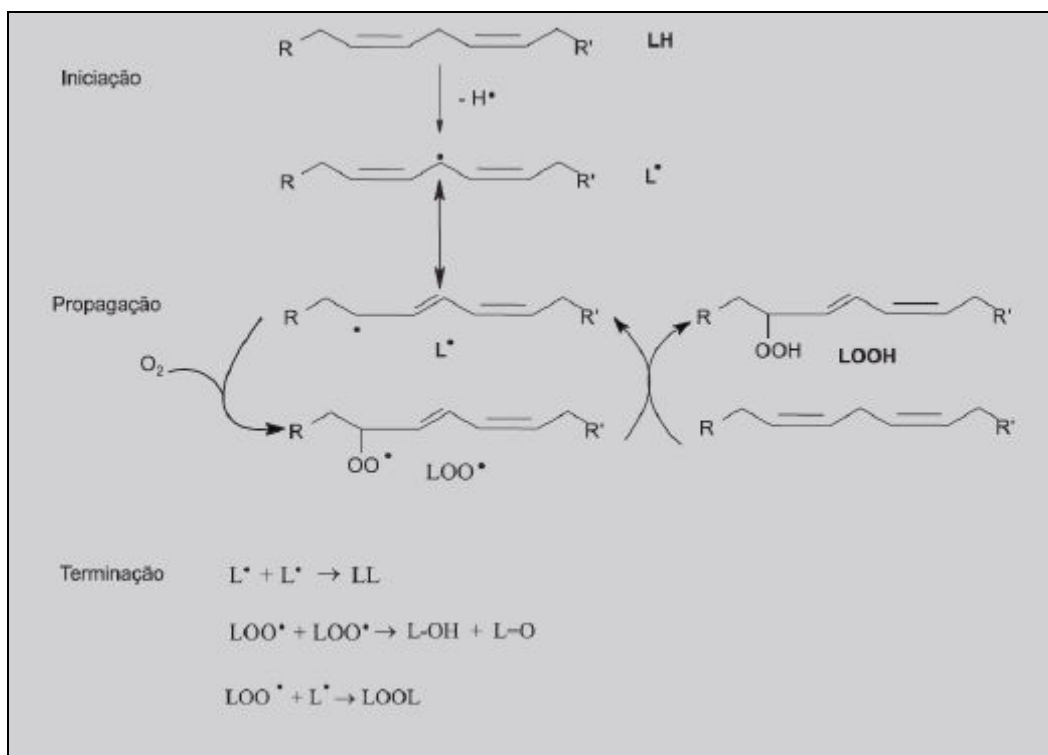
Os azeites de Quinta, nos quais todo o processo de produção, desde o cultivo da oliveira até ao embalamento do azeite, é realizado na área de exploração da quinta mas ainda não estão regulamentados (Custódio, 2009).

## **5- OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS E FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS NO AZEITE**

A hidrólise e a oxidação são os processos que mais contribuem para a deterioração da qualidade do azeite. A hidrólise, neste produto, tem o nome de lipólise e inicia-se ainda na azeitona (fruto), enquanto a oxidação ocorre depois do azeite ser extraído e, sobretudo durante o armazenamento (Dias, 2009).

### **5.1- Peroxidação Lipídica**

A oxidação dos lípidos ocorre devido a uma reacção em cadeia com três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa da iniciação as espécies reactivas de oxigénio (p. ex. HO) reagem com um substrato lipídico (LH), formando-se radicais lipídicos ( $L^*$ ). Estes radicais são instáveis e reagem com o oxigénio formando radicais peróxido lipídicos ( $LOO^*$ ). Estes também são instáveis e reagem com outra molécula lipídica, produzindo radicais idênticos, o que propaga a reacção. A reacção termina quando dois radicais se ligam, formando uma molécula estável não radical. Estas reacções não tendem a continuar até ao consumo total do estrato gordo, pois há um esgotamento prévio de oxigénio (Dias, 2009 e Grosch, 1999). A Figura 4 demonstra a peroxidação lipídica.



**Figura 2** - Diagrama da peroxidação lipídica

**Fonte:** Grosch, 1999

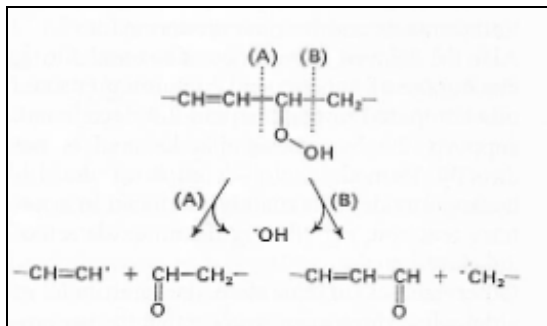
Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são ótimos substratos para a peroxidação lipídica devido à presença de grupos metileno bis-aliílicos activos. As ligações carbono-hidrogénio destes grupos têm uma baixa energia de dissociação, o que facilita a sua captura pelas espécies reactivas de oxigénio. A susceptibilidade de um determinado PUFA à peroxidação aumenta proporcionalmente com o número de locais insaturados da cadeia (Dias, 2009).

## 5.2- Oxidação Enzimática

Na decomposição de ácidos gordos polinsaturados estão envolvidos umas sucessões de reacções enzimáticas, iniciando-se a sequência com a hidrólise de diversos acilgliceróis, catalisada por lipases, acilhidrolases lipolíticas e fosfolipases. Após a libertação dos ácidos gordos polinsaturados, as lipoxigenases convertem os ácidos gordos insaturados em hidroperóxidos (Figura 5) e numa última fase, liases, isomerases



e desidrogenases transformam os hidroperóxidos em diversos compostos voláteis e não voláteis (Grosch, 1999).



**Figura 3-** Estrutura de monohidroperóxidos

**Fonte:** Grosch (1999)

### 5.3- Factores Externos que Influenciam a Oxidação do Azeite

A temperatura, a luz e a concentração de oxigénio são os factores externos com maior influência na oxidação do azeite (Gouveia, 1995).

O efeito da fotossensibilização é exercido através de compostos minoritários do azeite, tais como pigmentos que podem ser electronicamente excitados pela absorção de luz e transferência do excesso de energia para a molécula do oxigénio, criando o estado de singuleto favorável à adição de oxigénio a ácidos gordos (Gouveia, 1995).

Com temperaturas elevadas a concentração do oxigénio aumenta. A concentração de radicais alcóxido aumenta, em relação à dos radicais peróxido inicialmente formados e formando-se, também, compostos poliméricos a partir dos radicais alquilo e alcóxilo. Com temperaturas baixas ou moderadas, a velocidade de oxidação é baixa. Os hidroperóxidos são os compostos formados em maior quantidade e a sua concentração aumenta até às etapas avançadas da oxidação, quando se decompõem em compostos voláteis minoritários, em particular, em compostos carbonilo que podem modificar o aroma do azeite (Gouveia, 1995).

## 6- ANÁLISE DA QUALIDADE DO AZEITE

Para a avaliação qualitativa do azeite ser realizada, há que ter em conta o Regulamento CE 2568/91 de 11 de Julho, que nos clarifica sobre toda esta componente, desde a parte química à parte sensorial.

### 6.1- Métodos de Análise Química

As análises químicas feitas ao azeite, entre outras, são:

A **Acidez** (Panreac, 1999 e Fiorino, 1996) é a quantidade de ácidos gordos livres expressa em percentagem de ácido oleico. Uma acidez elevada, é consequência, entre outros, das azeitonas não estarem em perfeitas condições quando são laboradas ou do mau armazenamento do azeite. A percentagem de acidez de um azeite não tem relação com o seu sabor. Segundo a regulamentação do COI (Conselho Oleícola Internacional), o azeite próprio para o consumo humano deve ter uma acidez máxima de 2%.

O **Índice de Peróxidos** indica o estado de oxidação inicial do azeite e a sua deterioração. O limite do índice de Peróxidos para que o azeite seja considerado próprio para consumo humano é de 20 m.e.q. de  $O_2$  activo/kg (Panreac, 1999).

A **Absorvância no Ultravioleta** utiliza-se para detectar componentes anormais de um azeite. O valor é inferior a 0,25 para um azeite obtido de uma azeitona em óptima qualidade e obedecendo a todas as regras de processamento, envase e armazenamento (REG. 2568/91).

O **Teor em Ceras** é um parâmetro utilizado para verificar a genuidade de um azeite, o método serve para distinguir o azeite obtido por pressão do azeite obtido por extracção (Óleo de bagaço de azeitona) (REG. 2568/91).

A determinação das características dos azeites, também passa pela determinação do teor de esteróis, pela determinação do eritrodiol e uvaol, pela determinação da percentagem de monopalmitato de 2-glicerilo, por uma análise espectrofotométrica, pela determinação de ácidos gordos componentes e pela determinação dos solventes halogenados voláteis (REG. 2568/91).

### 6.2- Análise Sensorial

Segundo directrizes do conselho oleícola internacional (COI) (1996) o azeite deve ter uma cor entre o amarelo e verde e este parâmetro é avaliado de modo a garantir a ausência de cores não usuais no azeite. É importante notar que a cor não reflecte a qualidade do azeite, motivo pelo qual os degustadores profissionais utilizam pequenos copos de vidro azuis para que não deixem que a cor influencie a sua qualificação.

A análise sensorial torna-se um dos aspectos mais importantes na classificação e determinação das características organolépticas do azeite. Estas são definidas por um painel de provadores, através de uma sessão de degustação, pois este tipo de avaliação tem maior precisão do que através de equipamento laboratorial. A língua pode detectar textura o que é difícil medir analiticamente (Vossen, 2007)

Durante o processamento da azeitona, formam-se compostos voláteis nomeadamente aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas que contribuem para as sensações do sabor e do odor – flavor (Morales *et al.*, 2005).

No entanto, a análise sensorial pode ter desvantagens, devido a sensibilidade diferente de cada membro do painel e a necessidade de um longo período de treino. A necessidade de um painel de provadores treinados pode ainda apresentar desvantagens económicas, por ser extremamente dispendioso (Vossen, 2007).

Durante a prova, se as sensações forem agradáveis, poderão ser designadas de atributos, sendo conferidas pela variedade e estado de maturação da azeitona, mas se a azeitona estiver em mau estado de conservação ou se o seu processamento/armazenamento não forem os mais correctos, poderão surgir sensações desagradáveis, designadas por defeitos (Fiorino, 1996).

### ■ Atributos positivos (Vossen, 2007)

Os compostos mais abundantes com uma contribuição favorável para o aroma do azeite são os aldeídos e álcoois  $C_6$ , relacionados com os aromas herbáceos. Pequenas quantidades de cetonas  $C_5$ , dímeros de penteno ou monoterpenos também afectam o aroma, estando ligadas a características sensoriais positivas.

Frutado: Os ésteres estão ligados com o aroma frutado do azeite.

Pungente: Os aldeídos e álcoois  $C_5$  também dão um contributo positivo com sensações pungentes.

Amargo: O gosto amargo do azeite é considerado um atributo positivo, desde que não seja excessivo, estando relacionado com o teor total de compostos fenólicos.

### ■ Defeitos (Morales *et al.*, 2005)

Tulha: Os azeites produzidos com azeitonas amontoadas e num estado de fermentação avançado têm quantidades elevadas de compostos voláteis, sendo o defeito de “tulha” devido a ésteres e ácidos.

Húmido: O azeite com características a “húmido” é devido ao amontoar da azeitona sob condições de humidade com a consequência de desenvolvimento de fungos. Tem baixa concentração de E-2-hexenal e contém compostos que não estão presentes no azeite virgem extra, tais como compostos voláteis  $C_8$  e ácidos gordos de cadeia curta.

Avinhado ou avinagrado: O defeito de avinhado ou avinagrado deve-se à formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

Ranço: Os aldeídos insaturados são os principais constituintes para o atributo ranço. É uma característica sensorial para um processo de auto-oxidação causado pelo contacto prolongado com o ar.

São os aldeídos, cetonas ésteres, álcoois, hidrocarbonetos e furanos a que se atribui o aroma do azeite, mas considera-se que as enzimas endógenas das plantas, sobretudo a lipoxigenase, são responsáveis pelos aromas positivos percebidos, enquanto que as enzimas exógenas e a oxidação química, normalmente derivadas da actividade microbiana são responsáveis pelos defeitos sensoriais (Morales *et al.*, 2005).

Os compostos voláteis não contribuem directamente para o aroma, quando estão presentes em concentrações abaixo do seu limite de percepção olfactiva, mas podem ser importantes para compreender a formação e decomposição de outros compostos voláteis, podendo ser úteis como marcadores de qualidade, alguns dos compostos voláteis chegam ao epitélio olfactivo, podendo ligar-se aos receptores olfactivos e assim originar a sensação aromática (Vossen, 2007).

### **6.3- Análise de Compostos Voláteis em Azeite por Microextração em Fase Sólida (SPME)**

O azeite é uma matriz complexa com um elevado teor em compostos voláteis naturais com diferentes propriedades físico-químicas, tais como volatilidade e polaridade, mas num estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2008) verificou-se que a técnica de preparação HS-SPME juntamente com GC se tornou adequado, tanto a nível qualitativo como quantitativo, para os compostos aromáticos no azeite.

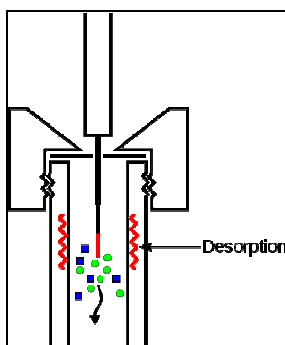
Os compostos voláteis possuem uma baixa massa molecular, sendo inferior a 300g/mol (Ribeiro *et al.*, 2008) e assim, tornam-se vaporizados rapidamente à temperatura ambiente, mas a microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extracção e pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, que apresenta muitas vantagens: sensibilidade e reprodutibilidade elevadas, simplicidade, ausência de solventes, baixo custo (Hinshaw, 2003; Ribeiro *et al.*, 2008; Sequeira, 2009 e Silva, 2007).

Em SPME não ocorre uma extracção exhaustiva, dado que o sistema tende para um equilíbrio em que os analitos se distribuem pelas diferentes fases do sistema (Hinshaw, 2003 e Ribeiro *et al.*, 2008).

Esta técnica que se baseia em mecanismos de adsorção e dessorção pode ser executada de três formas diferentes: adsorção directa (imersão), extracção em *headspace* e extracção com membrana protectora (Hinshaw, 2003). A extracção em *headspace* é a mais usada por vários motivos, destacando-se a ausência de contacto com a amostra, que reduz o efeito de matriz e evita a contaminação e decomposição da fibra. O tempo necessário para atingir o equilíbrio entre o analito na fase gasosa da amostra e a fase estacionária é menor do que para amostras aquosas, pelo que esta técnica é recomendada para análise de compostos muito voláteis (Hinshaw, 2003 e Ribeiro *et al.*, 2008).

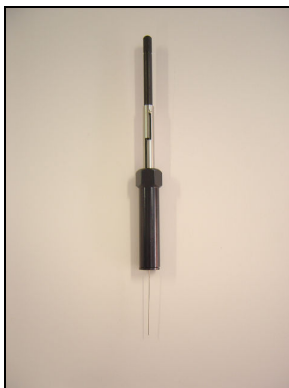
Do ponto de vista da metodologia, a SPME processa-se do seguinte modo: após a agulha ser colocada no septo do vial, a fibra é exposta ao *headspace* e os compostos voláteis retidos. Em seguida a fibra é recolhida e a agulha é retirada do vial.

Na dessorção (Figura 4), a fibra é colocada no injector do cromatógrafo gasoso, para os compostos serem dessorvidos e por fim, a fibra é recolhida e a agulha (Figura 5) retirada do injector (Ribeiro *et al.*, 2008 e Sequeira, 2009).



**Figura 4 - Fase de Dessorção**

**Fonte:** [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Solid\\_phase\\_microextraction\\_diagram.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Solid_phase_microextraction_diagram.svg)



**Figura 5** - Fotografia da agulha utilizada em todo o processo de SPME

A escolha da fibra depende da estrutura química dos compostos a analisar. A selecção cuidadosa da polaridade e espessura da fibra permite a extracção de compostos com polaridade e volatilidade diferentes, em simultâneo. Existem outras variáveis importantes, como: temperatura, agitação, pH e adição de um sal para ajudar a libertar os compostos (Ribeiro *et al.*, 2008).

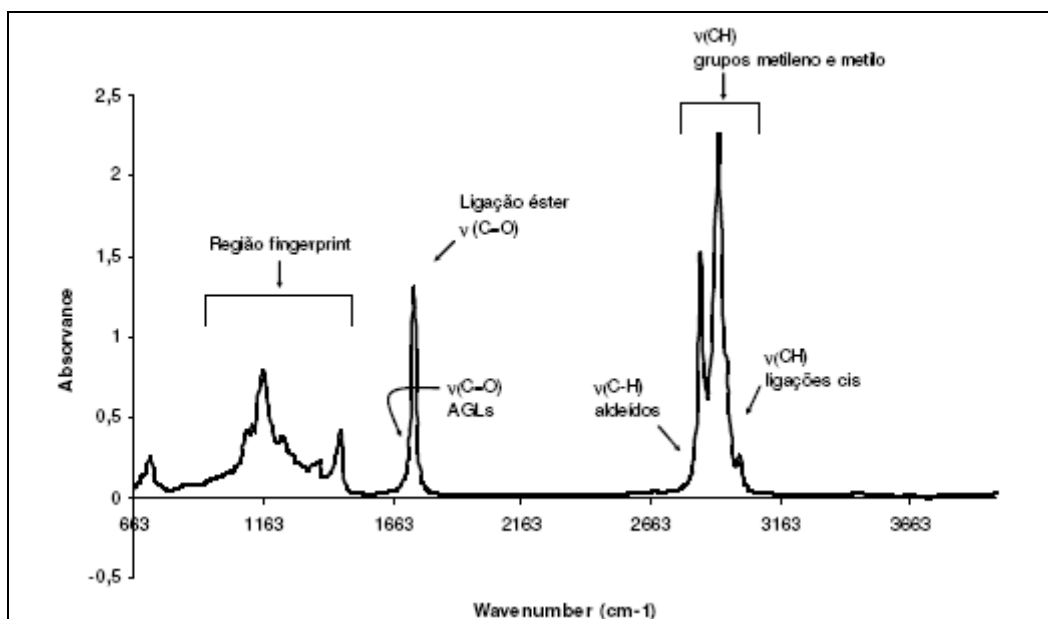
### 6.4- Análise de Espectros de Infravermelho

A espectrometria permite a determinação automatizada dos parâmetros de maior importância na caracterização de azeites e óleos (Moreira *et al.*, 2009). É uma metodologia que origina rapidamente uma informação sumária sobre o produto, não é poluente e muito versátil (Tozetto *et al.*, 2007).

Neste sub-capítulo é apresentado um dos espectros de FTIR-ATR e FTIR-NIR com as respectivas características, de forma a poder ser comparativo com o desenrolar do trabalho.

#### 6.4.1- FTIR

Nesta figura é representado o espectro de FTIR-ATR de uma amostra de azeite (Martins, 2005).



**Figura 6-** Espectro de FTIR-ATR de um azeite com indicação das regiões que contém absorvâncias de grupos funcionais específicos

**Fonte:** Martins, 2005

Os picos devidos ao modo de elongação C-H encontram-se na região entre 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$ , a elongação C=O na região de 1700-1800  $\text{cm}^{-1}$  e elongação C-O-C e deformação C-H na região de 900-1400  $\text{cm}^{-1}$  são facilmente observáveis (Martins, 2005).

Entre 4000-3050  $\text{cm}^{-1}$ , a única banda observada no espectro de um azeite limpo e seco é o primeiro sobretom da vibração de elongação C=O da ligação de éster do triglicérido. No entanto, quando humidade ou hidroperóxidos (ROOH) e os seus produtos de degradação e álcoois (ROH) se acumulam no azeite, as vibrações de elongação do OH são observadas na região entre 3700-3400  $\text{cm}^{-1}$ . A região 3025-2850  $\text{cm}^{-1}$  é dominada por bandas intensas devidas às absorções de elongação do CH dos grupos metileno e metilo terminais das cadeias de ácidos gordos dos triglicéridos. No extremo superior desta região, a absorção de elongação das ligações duplas *cis* (CH=CH) é observada; a absorção correspondente das ligações *trans* aparece a uma frequência ligeiramente mais alta mas mais fraca.

Um pouco abaixo do extremo inferior desta região, produtos da oxidação secundária, como aldeídos e cetonas absorvem, embora fracamente (Martins, 2005).

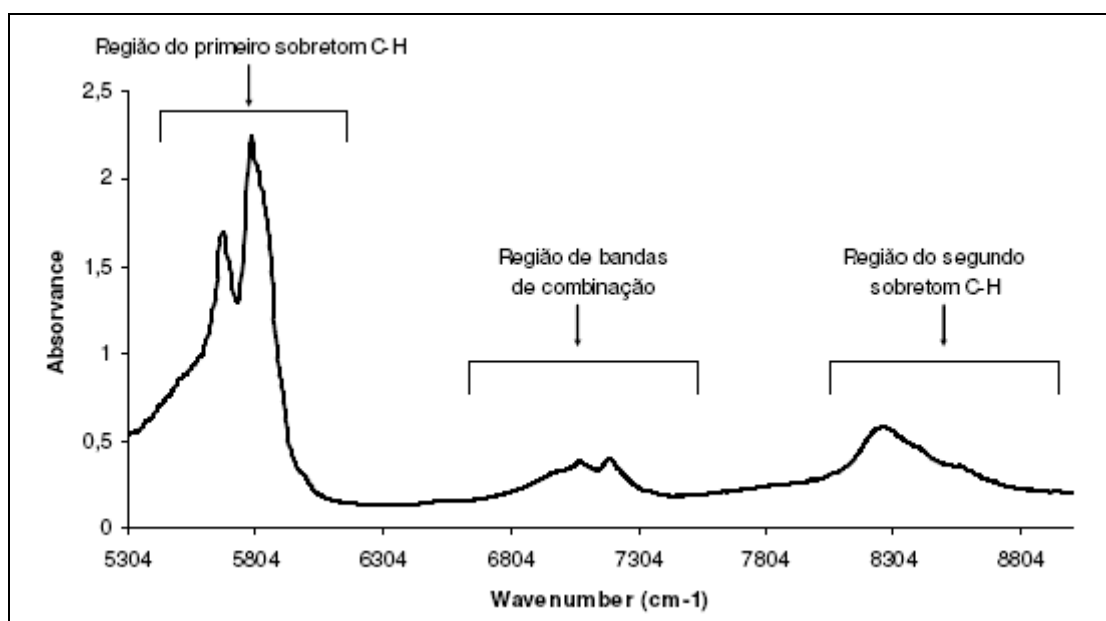
A cerca de 1740  $\text{cm}^{-1}$  é observada a banda de absorção muito intensa da ligação éster glicerol-ácido gordo. Se ocorrer lipólise, uma banda devida aos grupos carboxilo



(RCOOH) dos ácidos gordos livres libertados deve aparecer como um ombro no lado de menor frequência desta banda (Martins, 2005).

A região entre  $1500\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$  é denominada de região de impressão digital (fingerprint) porque qualquer composto puro tem um padrão distinto de absorção nesta região e pode ser usada para identificar inequivocamente a substância (Martins, 2005).

#### 6.4.2- NIR



**Figura 7-** Espectro de NIR característico de um azeite

**Fonte:** Martins, 2005

Segundo a mesma autora, os espectros de NIR, contrariamente aos de MIR, fornecem pouca informação estrutural interpretável. Como é apresentado na Figura 7, o espectro de NIR do azeite tem três bandas largas, que são compostas por sobretoms que se sobrepõem e combinações de modos vibracionais fundamentais que estão associados com as bandas dos espectros de MIR.

As duas bandas a  $5674$  a  $5786\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao primeiro sobretom da vibração de elongação CH do  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{HC}=\text{CH}-$ . Na região entre  $7700$  e  $9100\text{ cm}^{-1}$  pode ser encontrado o segundo sobretom da vibração de elongação CH do  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}=\text{HC}-$  (Martins, 2005).

## 7- DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS COM BASE EM AZEITE

O âmbito deste trabalho passa pela inovação, tentando criar produtos à base de azeite de maior valor acrescentado.

Segundo Aragão (2005), as duas principais empresas a operar neste mercado, no qual as marcas próprias desempenham igualmente um papel importante ao atingirem uma quota em volume de 22,7%, têm-se destacado pela forma como conseguiram inovar neste mercado, em virtude da necessidade de alterar toda uma lógica à qual o consumidor estava absolutamente condicionado, nomeadamente o grau de acidez do azeite. Nesse sentido, houve um esforço para a criação de novas categorias, com base, por exemplo, na utilização da gordura, e também para o desenvolvimento de novas propostas.

A inovação, depois de anos a fio de estagnação, tem finalmente marcado o sector. Oliveira da Serra que acaba de lançar Oliveira da Serra Sabores, a nova gama de azeites virgem extra, indicados para consumidores modernos que gostam de inovar e apreciar novos sabores (Aragão, 2005). Compreendendo o significado da evolução do azeite na cozinha e a apetência dos consumidores por novas experiências e pelos prazeres diários, este é o desafio lançado pela marca, ao aliar o azeite a sabores distintos. A mais recente inovação desta marca é a tampa Pop Up (Aragão, 2005).

No mercado dos azeites ainda há um longo caminho a percorrer na valorização e disseminação pelo retalho organizado dos azeites DOP, azeites de grande qualidade e que garantem diferentes sabores e texturas de acordo com a região de onde são originários. O caminho da inovação em azeite passa pelo desenvolvimento do segmento de maior qualidade e valor, o Azeite Virgem Extra (Aragão, 2005).

Segundo o mesmo autor, outro exemplo de inovação é a marca Gallo. A Gallo apostou na imagem, criando uma nova embalagem e ainda no lançamento de novos produtos. Lançou no mercado o Gallo Primeiro Azeite, extraído a frio, com uma acidez bastante reduzida e de sabor suave e delicado. Lançou ainda no mercado nacional outros produtos: o Azeite Gallo Colheita ao Luar (levemente picante), o Azeite Gallo Novo (comercializado no Brasil), o Azeite Gallo Colheita Tardia Delicado, o Azeite com Ervas Aromáticas – Estragão, Orégãos e Tomilho, a Pasta de Azeitona Gallo (azeitonas verdes ou pretas).

Ainda na área alimentar, segundo Rodrigues, 2009 e em terras da Beira Alta, uma empresa do Fundão, lançou o Azeite com Ouro (pepitas).

A empresa Diterra, tem-se dedicado à Manteiga de Azeite, que não é mais do que o azeite congelado, pronto a barrar. Esta empresa também comercializa azeite com a marca Almojanda, que muito recentemente lançou a Azeite Almojanda Com Malagueta (inteira dentro do frasco) (Jorge, 2009).

Também na área da cosmética o azeite tem lugar, com o lançamento de Sabonetes Vegetal de Azeite (IBT, 2009) e a Planet SPA da AVON utiliza azeite de oliva do mediterrâneo na sua gama de cosméticos.

Segundo Gonçalves (2009) na agricultura biológica, a produção de azeite biológico também foi de certa forma inovador e com óptimos resultados para o país.

### 7.1- Aroma de Limão

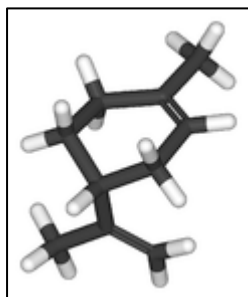
Como a inovação está sempre em paralelo à tradição e após uma pesquisa aprofundada efectuada por nós, observou-se que o azeite com aroma de limão poderia ter algum potencial no mercado nacional, pois, aliando a nossa produção de citrinos à produção de azeite poder-se-á obter um produto por excelência irreverente, beneficiando a dieta mediterrânica, contudo é o aroma a limão que terá um impacto mais positivo, visto ser uma receita já caseira que já se produz em qualquer casa portuguesa, por ter um sabor contrastante que vai minimizar o sabor da gordura do azeite.

A produção de citrinos no Continente representa 31% da produção total de frutos frescos, com a possibilidade de expansão da área e da produção na região do Algarve e do Alentejo, devido ao alargamento dos perímetros de rega (GPPAA, 2007).

O *flavour* é a associação entre o aroma e o sabor e é um factor de extrema importância para a aceitação de um produto no mercado, devido à sua função de atributo de qualidade. No caso do *flavour* do limão, os seus componentes voláteis são produzidos através do metabolismo durante o amadurecimento, colheita, pós-colheita e armazenamento da fruta e durante a produção que depende de muitos factores relativos à variedade e microclima (Oliveira, 2007).

Refere um estudo de Silva *et al.* (2009), de análise da composição química dos óleos essenciais extraídos da casca de limão (*Citrus limon* L. e *Citrus aurantifolia*), que estes são constituídos quase exclusivamente por monoterpenóides, sendo o principal constituinte o limoneno (39,9 - 94,4%), seguido da fracção das oleofinas que é maior que a das substâncias oxigenadas. Os terpenóides oxigenados que estavam presentes em praticamente todas as amostras, são:  $\alpha$ -terpineol, linalol, acetato de linalila, neral, geranial, acetato de nerila e acetato de geranila (Silva *et al.*, 2009).

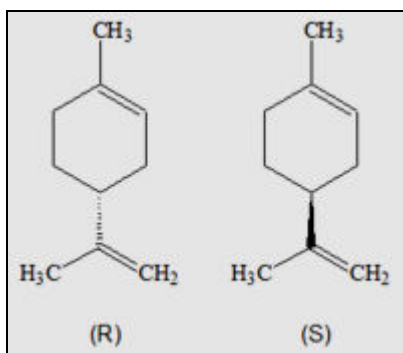
O flavour para o azeite aromatizado será proveniente do óleo essencial extraído da casca de limão, com o principal constituinte: limoneno.



**Figura 8-** Estrutura do Limoneno 3D

**Fonte:** Merck, 2010

O Limoneno (1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno) é uma substância química, orgânica, natural, pertencente à família dos terpenos, classe dos monoterpenos, de fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, encontrado em frutas cítricas (cascas principalmente de limões e laranjas), volátil, por isso responsável pelo cheiro que essas frutas apresentam. Industrialmente é utilizado para produzir p-cimeno por deshidrogenação catalítica (Figura 8 e 9). Nos últimos anos a sua procura tem aumentado muito devido ao seu uso em solventes biodegradáveis (Merk, 2010). As suas propriedades físicas estão descritas na Tabela 1.



**Figura 9-** Estrutura do Limoneno

**Fonte:** Merck, 2010

Por possuir um centro quiral, mais concretamente um carbono assimétrico, apresenta isomeria óptica. Portanto, existem dois isômeros ópticos: o D-limoneno e o L-limoneno. A nomenclatura IUPAC correcta é R-limoneno e S-limoneno (Figura 9), porém utiliza-se com mais frequência os prefixos D e L (Merck, 2010).

**Tabela 1-** Propriedades Físicas do Limoneno

PROPRIEDADES DO LIMONENO	
<b>Massa Molar</b>	136, 24 g/mol
<b>Densidade</b>	0,8411g/cm
<b>Rotação Óptica</b>	87° -102°
<b>Ponto de Fusão</b>	-74,35°C
<b>Ponto de Ebulição</b>	176°C

## 8- PROCESSO DE EXTRACÇÃO POR ALTA PRESSÃO

O processamento de alimentos por Alta Pressão (AP) é uma tecnologia inovadora (ZHANG *et al.*, 2005), que vem como solução às exigências dos consumidores que pretendem produtos mais seguros, com mais qualidade em textura, cor, aroma e sabor, minimamente processados, sem aditivos e estáveis (Santos, 2009).

Com os tradicionais tratamentos térmicos, o aquecimento pode provocar alterações indesejáveis nos produtos, tais como a redução de propriedades nutritivas e organolépticas (Santos, 2009). Sugere-se assim, na indústria alimentar a utilização de tratamentos não térmicos (AP), com todo o seu benefício (Santos, 2009 e Zhang *et al.*, 2007).

A AP foi durante muito tempo usada em cerâmica, metalúrgica, plásticos, engenharia civil, farmacêutica e na indústria alimentar, contudo nos últimos tempos, tem sido uma tecnologia utilizada para extracção na área da medicina chinesa (Bi *et al.*, 2007; Santos, 2009; Zhang *et al.*, 2005 e Zhang *et al.*, 2007). Recentemente a AP tem sido iniciada para extracção de compostos naturais.

Neste processo de extracção por AP, o material é misturado com um solvente à temperatura ambiente e colocado numa embalagem específica para resistir à pressão, depois o produto resultante vai ser pressurizado entre 100 e 1000 MPa, durante um certo tempo (Bi *et al.*, 2007; Santos, 2009; Zhang *et al.*, 2005 e Zhang *et al.*, 2007).

Com a aplicação da AP há um aumento da permeabilidade das células quando pressurizadas, levando a uma maior entrada de solvente nas células e assim a uma maior solubilização de compostos no solvente. A diferença de pressão entre o exterior e interior das membranas é tão grande que leva à permeabilização instantânea, alcançando-se o equilíbrio de concentração entre o exterior e o interior da célula, num curto espaço de tempo (Santos, 2009).

Vários estudos enunciam as vantagens que a extracção por AP demonstra, tais como, menor tempo de extracção, baixo consumo energético, menos impurezas no produto final, é realizado à temperatura ambiente, não interfere com nutrientes, actividade e estrutura de componente essenciais, evita perdas de compostos voláteis e maior rendimento na extracção de componentes (Bi *et al.*, 2007; Santos, 2009; Zhang *et al.*, 2005 e Zhang *et al.*, 2007). Num estudo feito por Xi (2006), para estudar o efeito da AP na extracção de licopeno do tomate, verificou-se que o rendimento de extracção por AP (400 e 500MPa) durante 1 minuto foi superior ao obtido através da extracção tradicional com solventes durante 30 minutos. Outro estudo, feito por Zhang *et al.* (2006), para estudar o efeito da AP na extracção de ginsenosídeos da *Panax quinquefolium* L., verificou-se que comparando com outros métodos de extracção como ultra-sons, em refluxo, CO<sub>2</sub> supercrítico e com Soxhlet, a extracção por AP, em dois minutos teve maior rendimento.

Não existe actualmente nenhum estudo sobre a utilização de AP, para extracção de limoneno, com eventual utilização na indústria do azeite nacional.

### 9- OBJECTIVOS

Face à necessidade do sector oleícola em inovar e na perspectiva de aromatizar azeite com citrinos, contribuindo de igual forma com os seus múltiplos efeitos benéficos, os objectivos deste trabalho passam por:

- Definir condições para aromatização do azeite com casca de limão;
- Avaliar a qualidade do azeite aromatizado com casca de limão;
- Estudar a viabilidade da utilização da Alta Pressão para extracção do óleo essencial da casca de limão, para aromatizar o azeite;

## CAPÍTULO II – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

### 1- CARACTERÍSTICAS DO AZEITE

O azeite utilizado nos ensaios foi comprado em superfícies comerciais, da marca Gourmet – Pingo Doce. É um azeite virgem extra, devido ao processamento mecânico que é sujeito. A apresentação é de 0,75L. A data de validade é de Setembro de 2011 com o lote: L10096. Apresentam-se os parâmetros de qualidade na tabela 2.

**Tabela 2-** Parâmetros de qualidade do azeite utilizado nos ensaios, de acordo com o rótulo

Parâmetros de Qualidade	Valores
Acidez máxima	0,7%
Índice de Peróxidos	20meq.O <sub>2</sub> /kg
Ceras (mg/kg)	250
K <sub>232</sub>	2,50
K <sub>270</sub>	0,22
Delta K	0,01

Recorreu-se sempre à mesma marca de azeite com o mesmo lote e data de validade, para os ensaios realizados.

### 2- PROCEDIMENTO COM CASCA DE LIMÃO

Os limões depois de limpos foram descascados, delicadamente, com um descascador da Tupperware®, onde se retirou a película envolvente do limão, que é a parte que contém os óleos essenciais. As cascas foram colocadas numa tina e misturadas. Procedeu-se à pesagem, numa balança analítica e iniciou-se a preparação das amostras.



### 3- AMOSTRAS DE AZEITES AROMATIZADOS COM TANGERINA, LARANJA E LIMÃO

Retirou-se a casca do limão e esta foi espremida para um vidro de relógio, misturando-se com um pouco de azeite. Com a ajuda de uma pipeta, colocou-se a mistura dentro de uma garrafa (100mL) e perpez-se com azeite. Realizou-se o mesmo procedimento para a laranja e a tangerina.

Cortou-se a casca do limão em pedaços de dimensões reduzidas (~0,5cmx0,5cm), foram pesadas, aproximadamente 0,5g e colocaram-se numa garrafa (100ml), que se encheu com azeite. O procedimento foi repetido para a laranja e a tangerina. Numa garrafa com as mesmas características foi colocado o azeite testemunha.

Deste procedimento resultaram as seguintes amostras (Tabela 3) que foram analisadas por NIR:

**Tabela 3-** Amostras que foram analisadas por NIR

AMOSTRA	NOME
Testemunha	T1
Casca de tangerina triturada	Tang_casca
Óleo da casca de tangerina	Tang_oil
Casca de laranja triturada	Lar_casca
Óleo da casca de laranja	Lar_oil
Casca de limão triturada	Li_casca
Óleo da casca de limão	Li_oil

A aquisição dos espectros de NIR foi realizada 63 dias após a realização das amostras, a determinação do índice da acidez após 70 dias e a determinação dos índices de peróxidos após 78 dias.

#### 4- CARACTERÍSTICAS DO COMPOSTO PADRÃO

O composto padrão usado como referência, para cálculo da curva de calibração do limoneno, foi o (R) - (+) - Limoneno 97% (98% ee/GLC) da Aldrich, na apresentação de 5ml.

A preparação da Solução Mãe passou por adicionar 100 µL do composto padrão adquirido, a 100 mL de azeite. Tendo em conta densidade e pureza do limoneno, a concentração da Solução Mãe obtida é de 81,4 ppm. De seguida, prepararam-se as diluições a partir da Solução Mãe (Tabela 4), tendo sido realizadas oito, servindo para construir a curva de calibração do limoneno.

**Tabela 4-** Diluições para determinação de pontos para a curva de calibração do limoneno

SOLUÇÃO MÃE (mL)	QUANTIDADE DE AZEITE (mL)
0,1	9,9
0,2	9,8
0,5	9,5
1,0	9,0
1,5	8,5
2,0	8,0
4,0	6,0
6,0	4,0

## **5- ENSAIO DE AZEITES AROMATIZADOS COM CASCA DE LIMÃO**

Foi realizado um estudo de estabilidade dos azeites aromatizados com 10,5g/kg e 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias, tendo como objectivo avaliar as suas características, através do índice de acidez, do índice de peróxidos e da quantidade de limoneno extraído, por SPME e FTIR.

O azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, só ficou em contacto com as cascas durante a primeira semana do estudo (7 dias), tendo sido de seguida decantado.

Comparando os dados químicos com os indicadores de qualidade, com o azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite pretende-se determinar se existe perda de concentração de limoneno ao longo de 60 dias, já que foi adicionada maior quantidade de casca, para garantir que o limoneno fica no azeite até finalizar o estudo.

Com o azeite aromatizado com 5g/kg de azeite pretende-se determinar se a concentração do limoneno aumenta ao longo dos 60 dias.

## **6- ENSAIOS DE EXTRACÇÃO À PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

O estudo da extracção de limoneno para o azeite foi realizado à pressão atmosférica. Foi realizado em função do tempo de contacto, ou seja, o modo de procedimento passou por adicionar, aproximadamente 0,5g de casca de limão a 35 mL de azeite e deixar em contacto por 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Depois de devidamente homogeneizadas, foram feitas réplicas para análise por SPME/GC-FID.

Também se procedeu à preparação de amostras de azeite intensamente aromatizado com limoneno da casca de limão. Para tal, a casca de um limão inteiro, com aproximadamente 8,5g esteve em contacto com 20 mL de azeite, durante 3 horas, numa tina tapada.

Após este tempo de contacto, a amostra foi homogeneizada, procedendo-se à decantação do azeite para uma proveta. Num frasco de 35 ml, foi colocado 1 ml do azeite decantado e perfez-se a restante quantidade com azeite de garrafa. O conteúdo desta diluição foi homogeneizado e as réplicas analisadas por SPME/GC-FID.

## 7- ENSAIOS DE EXTRACÇÃO À ALTA PRESSÃO

Todos os ensaios realizados à AP tiveram uma amostra controlo realizada à pressão atmosférica.

Para a preparação destas amostras foram utilizados frascos de polietileno, com capacidade para 35mL. As cascas de limão foram pesadas, na mesma balança analítica e sempre na mesma quantidade (aproximadamente 0,5g). Eram colocadas dentro dos frascos/sacos e cheios com azeite. Os frascos/sacos foram devidamente identificados e procedia-se ao ensaio, variando o tempo de contacto e pressão. Foram realizadas réplicas para análise por SPME/GC-FID.

### **Em frasco**

Para a preparação destas amostras foram utilizados frascos de polietileno, com capacidade para 35mL. As cascas de limão foram pesadas, na mesma balança analítica e sempre na mesma quantidade (aproximadamente 0,5g). Foram colocadas dentro dos frascos e cheios com azeite. Os frascos foram devidamente identificados e procedeu-se ao ensaio, com pressurizações de 100, 200 e 300 MPa, durante 5 e 15 minutos.

Após a pressurização, o conteúdo do frasco foi homogeneizado procedendo-se à decantação do azeite para uma proveta, voltando novamente a ser agitado, após ser tapado imediatamente. Desta forma consegue-se uma boa homogeneização do limoneno no azeite, para em seguida ser analisado por SPME/GC-FID.

### **Em saco**

Foi feito um ensaio a AP, em que se comparou o resultado do frasco com o resultado de um saco específico para esse efeito. Também se procedeu à realização de um ensaio em que quatro amostras com quantidades crescentes de casca de limão que foram submetidas a pressurização, nas condições de 100 MPa durante 15 minutos. Estas amostras foram pesadas com aproximadamente 0,5, 1, 1,5 e 2g de casca de limão e adicionadas a 5 mL de azeite num saco. Após pressurização a 100 MPa, durante 15

minutos, o azeite destas amostras, aproximadamente 5mL, foi colocado com uma pipeta de Pasteur, num balão de 100 mL e perpez-se a restante quantidade com azeite de garrafa. Os quatro balões foram tapados com as respectivas rolhas. Os conteúdos foram homogeneizados e realizaram-se réplicas para análise por SPME/GC-FID (método de extracção).

## CAPÍTULO III – METODOLOGIA APLICADA

### 1- ÍNDICE DE ACIDEZ

A acidez foi determinada de acordo com o anexo II do Regulamento da Comissão Europeia nº 2568 de 11 de Julho de 1991, com a seguinte modificação: o peso da toma do ensaio foi de aproximadamente 10g, independentemente do índice de acidez presumido, num balão de erlenmeyer de 250 mL.

Dissolveu-se a toma em 50 mL da mistura de etanol/tolueno previamente neutralizada. Titulou-se, com agitação, com a solução etanólica de hidróxido de potássio até ao ponto de viragem do indicador (coloração carmim da fenolftaleína persistente pelo menos durante 10s).

Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

As percentagens de acidez foram calculadas segundo a fórmula:

$$\frac{V * C * M}{10 * m}$$

V= volume de hidróxido de sódio gasto na titulação

c= concentração exacta da solução de hidróxido de sódio em moles por litro

M= massa molar do ácido oleico em g/mol

m= massa da amostra em gramas

### 2- ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia nº 2568 de 11 de Julho de 1991.

Pesou-se uma massa de toma de ensaio, aproximadamente com 1,2 g, em conformidade com o índice de peróxidos presumido. Os ensaios foram realizados em presença de luz solar difusa e luz artificial.

À massa da toma pesada num erlenmeyer de 250 mL, adicionaram 10 mL de clorofórmio (tornado isento de oxigénio, ou seja, borbulhado com N<sub>2</sub>) e dissolveu-se a toma sob agitação. Adicionaram-se 15mL de ácido acético (tornado isento de oxigénio) e, de seguida 1mL de iodeto de potássio. Tapou-se rapidamente, agitou-se durante 1 minuto e deixou-se 5 minutos em ausência de luz a uma temperatura entre 15 e 20°C. Adicionaram-se 75 mL de água destilada. Titulou-se o iodo libertado com a solução de tiossulfato de sódio a 0,01N (para valores presumidos superiores a 12), agitando vigorosamente e usando solução de amido como indicador do ponto de viragem.

As amostras foram analisadas em duplicado.

Foi realizado um ensaio em branco. Se o resultado do ensaio em branco exceder 0,05 ml de solução de tiossulfato de sódio 0,01N, substituem-se os reagentes impuros. Os valores de índice de peróxidos foram calculados segundo a fórmula:

$$\frac{V * T * 1000}{m}$$

V= volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação, tendo em conta o ensaio em branco

T= normalidade exacta da solução de tiossulfato de sódio

m= massa da amostra em gramas

### 3- FTIR

A aquisição de espectros de infravermelho médio foi efectuada num espectrómetro de infravermelho de Fourier da Perkin Elmer, modelo Spectrum BX (Figura 10), equipado com um acessório de ATR horizontal de reflexão única (Golden Gate). Para a aquisição e

processamento de resultados foi utilizado o software Spectrum. Foram efectuadas 5 réplicas para cada amostra.



**Figura 10** - Espectrómetro de Infravermelho de Fourier

As amostras de azeite foram colocadas sobre o cristal, com a ajuda de uma pipeta. Os espectros foram medidos na região entre  $4.000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Todos os espectros foram obtidos a uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 scans. Entre amostras foi realizado um background. O cristal foi lavado com etanol entre a leitura de amostras e limpa entre réplicas.

#### **4- NIR**

A aquisição de espectros de infravermelho próximo foi realizada num espectrómetro Perkin Elmer modelo Spectrum One (NTS-FT-NIR), equipado com um acessório NIRA e a medição feita por transflectância. Para a aquisição e processamento de resultados foi utilizado o software Spectrum. Os espectros de FT-NIR dos azeites foram obtidos à temperatura ambiente, no intervalo entre  $10.000$ - $4.000\text{ cm}^{-1}$ , com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 50 varrimentos (Scan: 50). Para cada amostra foram adquiridos 5 espectros (réplicas).

Entre as amostras e no início, deve-se fazer leitura do background, usando as mesmas siglas para identificar as amostras.



### 5- SPME

A fibra utilizada foi a Polydimetilsiloxane (PDMS) da Supelco, de 100  $\mu\text{m}$ , por possuir um revestimento não polar, o que se torna muito eficiente na extracção do limoneno, possivelmente, por este ser um composto apolar e assim, possuir uma maior afinidade com o revestimento desta fibra (Oliveira *et al.*, 2007).

Para estes ensaios a SPME processa-se do seguinte modo: as amostras foram devidamente preparadas/homogeneizadas e colocadas, em quantidade de 10mL, em frascos de vidro, que eram imediatamente encapsulados. Foram feitas duas réplicas.

Numa placa de aquecimento, foi feito um banho termostaticado à temperatura de 50°C, onde a amostra sob agitação, de 200 rpm, permaneceu durante 10 minutos.

Iniciou-se a fase da adsorção (Figura 12), em que a agulha ao ser colocada no septo do vial, a fibra é exposta ao *headspace*, durante 15 minutos a 50°C e agitação de 200 rpm. Os compostos voláteis são retidos e em seguida a fibra é recolhida e a agulha é retirada do vial. A injeção foi feita de forma manual.

Na dessorção, a fibra é colocada no injector do cromatógrafo gasoso, para os compostos voláteis serem dessorvidos, durante 3 minutos após ao quais, a fibra é recolhida e a agulha retirada do injector. Por fim, e com o software adequado, determina-se a área do limoneno para posterior tratamento.



**Figura 11-** Placa de aquecimento, fase de adsorção

## 6- GC-FID

O cromatógrafo utilizado foi o Perkin Elmer, modelo Clarus 400 – Gás Chromatograph (Figura 11), com as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna capilar: DB-FFAP, 30m\*0,32m
- Espessura do revestimento interno da coluna capilar: 0,25m
- Gás de arraste: H<sub>2</sub>, 2,6 ml/minuto
- Pressão na cabeça da coluna: 14 psi
- Detector: FID, 250°C
- Injector: “Splitless”, CAP, 250°C
- Tempo de corrida: 6min
- Temperatura de forno: 30° C para 0,00 min
- Rampa 1: 10,0°C/min até 80°C, esperando por 1min
- Extracção: *headspace*
- Aquisição de dados: TotalChrom Navigator



**Figura 12-** Cromatógrafo utilizado para a realização dos ensaios com a agulha

## **7- ALTA PRESSÃO**

Os ensaios foram realizados no equipamento High Pressure U33 (Figura 13), desenvolvido pelo Institute of High Pressure Physics – Unipress Equipment Division, ano 2006, com nº de série 1139/06, Polónia, com as seguintes características (Tabela 5):

**Tabela 5-** Características do equipamento onde foram realizados os ensaios de AP

<b>CARACTERÍSTICAS DO EQUIPAMENTO DE ALTA PRESSÃO</b>	
<b>Máxima Pressão</b>	700 MPa
<b>Temperatura</b>	-20/100°C
<b>Volume</b>	100ml
<b>Dimensões do vaso</b>	ø35 * 100mm
<b>Voltagem</b>	230V; 1,5Kw

Nos ensaios onde se efectuou pressurização, as amostras dependendo do tempo (entre 5 e 15 minutos) e da pressão (entre 100MPa e 300MPa), foram submetidas ao mesmo procedimento.

As amostras de azeite foram colocadas em frascos de polietileno, de 35 mL de capacidade. Estes, por sua vez, foram colocados num saco específico para pressurizar, sendo de seguida sujeitos a vácuo e selados, pela Máquina de Vácuo – Albipack Packaging Solutions. Este procedimento permite reduzir a quantidade de ar no seu interior, para posterior pressurização (Santos, 2009). Nos casos em que o frasco foi substituído por saco, o procedimento foi igual ao mencionado para os frascos.

Colocou-se um saco com o frasco no vaso de pressão e pressurizou-se a 23°C, à pressão e tempo desejados, utilizando como fluido de pressurização, uma mistura de propilenoglicol/água, à razão de 60:40.

O vaso de pressurização do equipamento possui um revestimento externo ligado a um banho termostatização, para controlo da temperatura (Santos, 2009).

Obtendo-se o tempo de pressurização desejado e após a descompressão, retira-se o saco envolvente e a amostra contida no frasco ou no saco é devidamente

homogeneizada e na quantidade pretendida (10mL) é separada em frascos para posterior análise por SPME/GC-FID. Foram sempre realizadas duas réplicas.



**Figura 13-** Equipamento de Alta Pressão

**Fonte:** Santos, 2009

## **8- ANÁLISE MULTIVARIADA**

A análise foi realizada com o programa CATs. Foi realizada Análise de Componentes Principais (PCA), para verificar as semelhanças entre as amostras projectadas num plano de dois eixos que representa a maior variância dos dados e torna possível identificar as variáveis que determinam estas semelhanças e de que forma (Custódio, 2009).

A PCA pode ser utilizada como método de simplificação de dados através do agrupamento de variáveis correlacionadas. Deve notar-se, no entanto, que esta redução da dimensão pode conter alguns erros, pelo facto de as correlações encontradas, baseadas num número reduzido de amostras, poderem estar a ser sobrestimadas (Custódio, 2009).

De qualquer forma, tendo este facto em conta, a PCA permite uma análise do comportamento entre as diferentes variáveis, de forma objectiva e sistemática, pelo que foi utilizada neste trabalho (Custódio, 2009). Ensaios demonstram a importância na

utilização da PCA no tratamento de dados obtidos via espectroscopia por infravermelho – FTIR (Tozetto *et al.*, 2007).

### IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

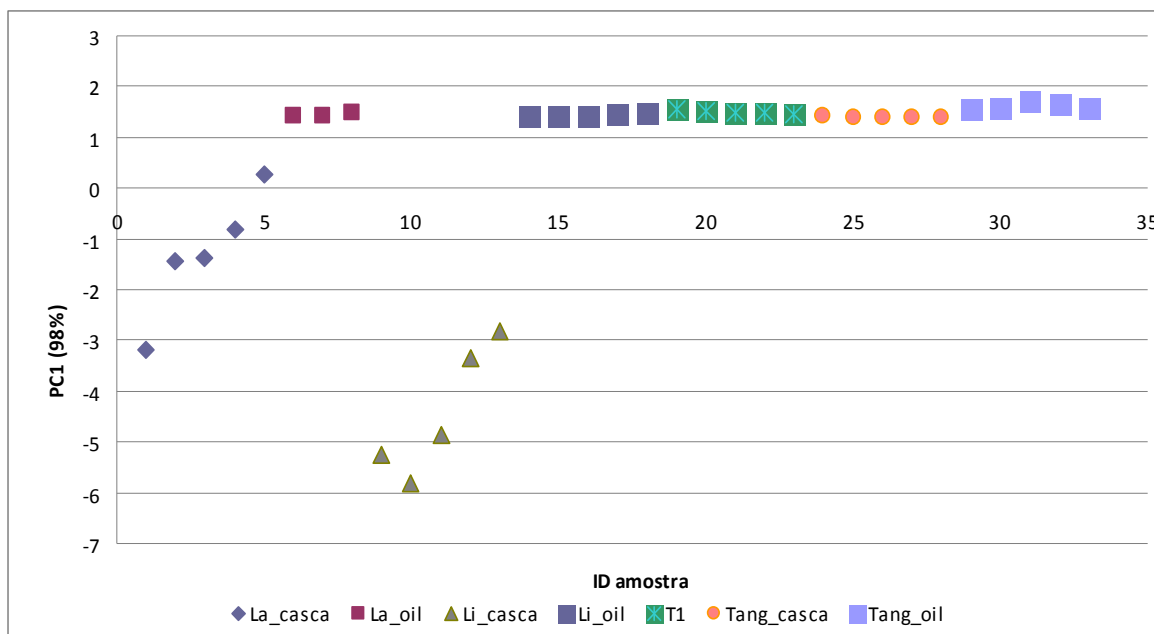
#### 1- AZEITES AROMATIZADOS COM TANGERINA, LARANJA E LIMÃO

Iniciou-se, este trabalho, verificando a aromatização de um azeite com os citrinos mais produzidos/comercializados no nosso país, recorrendo desta forma, à tangerina, laranja e limão. Foram preparadas as amostras de acordo com o descrito no Capítulo II e adquiriram-se espectros de NIR das respectivas amostras.

##### 1.1-Análise Multivariada

O elevado conteúdo de informação de um espectro de infravermelho (IV) e a capacidade de atribuir bandas a grupos funcionais particulares, justificam a relevância da espectroscopia de infravermelho no estudo da estrutura molecular de lípidos e o interesse presente na análise de IV de óleos e gorduras (Martins, 2005).

A aquisição dos espectros em NIR, dos azeites aromatizados com cascas e óleos essenciais de tangerina, laranja e limão, foram realizados 63 dias após a preparação das amostras.



**Figura 14-** Coordenadas factoriais da primeira componente principal para os dados do NIR

A Primeira Componente Principal (PC1) explica 98% de variância total (Figura 14). Verifica-se a existência de uma separação entre os azeites aromatizados com casca de laranja (La\_casca) e limão (Li\_casca) e os restantes: azeites aromatizados com casca de tangerina (Tang\_casca) e óleos essenciais espremidos da casca de limão (Li\_oil), laranja (La\_oil) e tangerina (Tang\_oil) e o azeite testemunha (T1).

Pela análise da Figura 14, verifica-se que, apenas as amostras com casca de laranja (La\_casca) e com casca de limão (Li\_casca) apresentam diferenças, quando comparadas com a testemunha.

## 1.2- Índice de Acidez

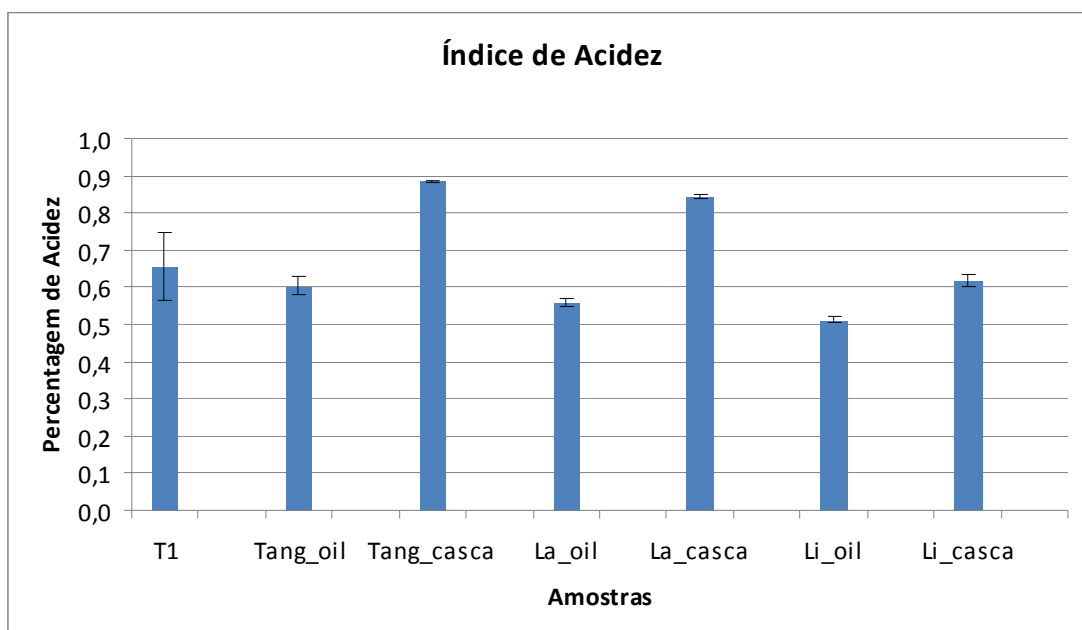
A percentagem de acidez de um azeite não tem qualquer relação com o seu sabor, pelo que, este índice permitirá apenas avaliar a quantidade de ácidos gordos livres em percentagem de ácido oleico, sendo consequência, por exemplo, das condições de laboração das azeitonas ou do acondicionamento do azeite, por exemplo.

Na Tabela 6 são apresentados os valores resultantes das determinações efectuadas para o índice de acidez, aos azeites aromatizados com casca e óleo extraído a partir da casca de tangerina, laranja e limão.

**Tabela 6-** Resultados de determinações de índice de acidez, para os azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão

AMOSTRA	Í. ACIDEZ (%)	DESVIO PADRÃO
T1	0,65	0,09
Tang_oil	0,60	0,02
Tang_casca	0,89	0,00
La_oil	0,56	0,01
La_casca	0,84	0,00
Li_oil	0,51	0,01
Li_casca	0,62	0,02

Na Figura 15, compara-se o índice de acidez de um azeite testemunha com os índices de acidez das variadas amostras aromatizadas preparadas 70 dias antes.



**Figura 15-** Índice de acidez para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão



Após determinação do Índice de Acidez, verificou-se que o azeite testemunha (T1) possui uma acidez de 0,65%, em concordância com o que vem descrito no rótulo da garrafa, que é 0,7% de Acidez Máxima. Verifica-se que a acidez das amostras com óleos essenciais (La\_oil e Li\_oil) é menor do que a da testemunha (T1). Podemos atribuir este facto à eventual neutralização do azeite, por parte dos componentes do óleo essencial. No caso dos azeites com adição de cascas (Tang\_casca, La\_casca e Li\_casca), e comparando com a testemunha (T1) a acidez é superior com a tangerina e a laranja, sendo ligeiramente inferior para amostra aromatizada com limão.

Todos os resultados estão dentro do limite máximo imposto no Reg. 2568/91, para o consumo humano, que é de 2% de acidez máxima.

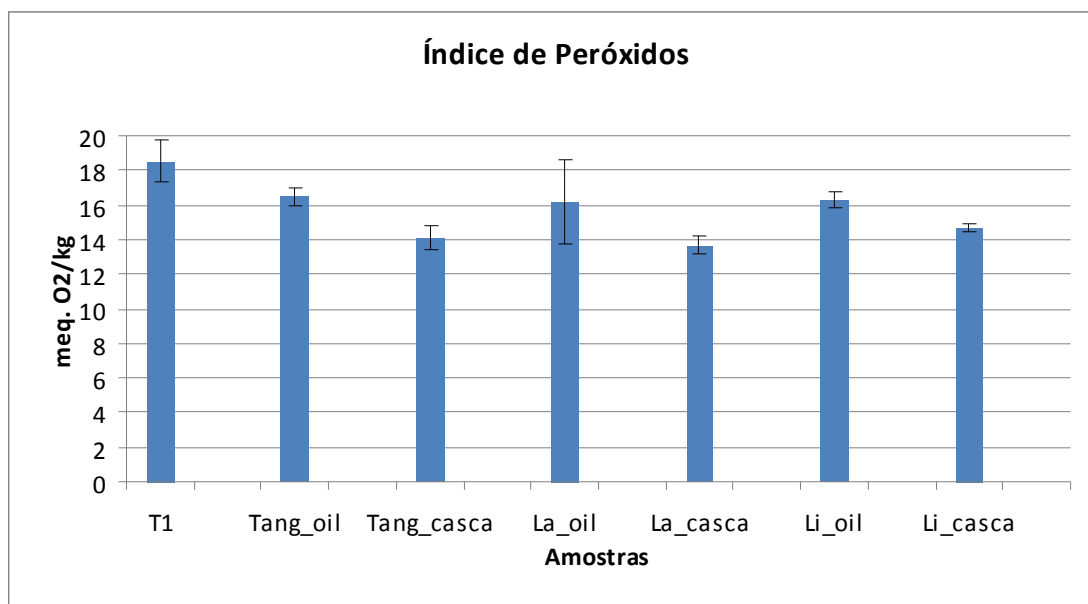
### 1.3- Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos mede o estado de oxidação do azeite e é uma indicação do seu estado de deterioração. Na seguinte tabela (Tabela 7) apresentam-se os valores resultantes das determinações feitas para o índice de peróxidos, aos azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão.

**Tabela 7-** Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão

AMOSTRA	Í. PERÓXIDOS (meq.O <sub>2</sub> /kg)	DESVIO PADRÃO
T1	18,54	1,23
Tang_oil	16,48	0,55
Tang_casca	14,06	0,68
La_oil	16,16	2,40
La_casca	13,69	0,51
Li_oil	16,34	0,46
Li_casca	14,69	0,21

Na Figura 16 apresentam-se os resultados de determinação do índice de peróxidos, 78 dias após a preparação das amostras.



**Figura 16-** Índice de peróxidos para azeites aromatizados com tangerina, laranja e limão

O valor do índice de peróxidos descrito no rótulo da garrafa do azeite é de 20 meq.O<sub>2</sub>/kg. O índice de peróxidos para o azeite testemunha (T1) foi de 18,54 meq.O<sub>2</sub>/kg ( $\pm 1,23$ ), sendo um valor alto, comparando com as amostras dos azeites aromatizados com limão, laranja e tangerina (La\_oil, La\_casca, Tang\_oil, Tang\_casca, Li\_oil e Li\_casca).

Verificou-se que o valor de índice de peróxidos é mais alto nos azeites com adição de óleos extraídos de casca (La\_oil, Tang\_oil e Li\_oil) do que nos respectivos azeites com adição de cascas (La\_casca, Tang\_casca e Li\_casca).

A adição de óleos essenciais e de cascas ao azeite, parece actuar como antioxidante, evidenciando uma diminuição do índice de peróxidos, comparando com o valor obtido para o azeite testemunha. Pode especular-se que os compostos presentes nas cascas do limão e nos óleos essenciais, poderão ter um papel importante, evidenciando um comportamento de protecção, por exemplo actuando como estabilizadores de radicais livres.

Todos os resultados estão dentro do limite máximo imposto no Reg. 2568/91, que é de 20 meq.O<sub>2</sub>/kg.

Em conclusão, verifica-se que o limão, sob a forma de casca apresenta melhor potencialidade para aromatizar azeite, sendo as restantes amostras eliminadas do estudo, pois a análise de componentes principais (PCA) aplicada aos dados dos espectros de NIR, permitiu visualizar que apenas a casca de limão e a casca de laranja poderiam produzir características diferentes no azeite a aromatizar.

A determinação do índice de acidez (valores apresentados na Tabela 6) serviu para eliminar as amostras de casca de tangerina e de casca de laranja. Os valores do índice de acidez destas amostras verificou-se ser superior à indicada do azeite testemunha.

Pelo índice de peróxidos e como se pode verificar pelos resultados apresentados na Tabela 7, não haveria exclusão de nenhuma amostra, visto o resultado ser menor que o permitido por lei (20 meq.O<sub>2</sub>/kg).

A casca da laranja foi um componente no qual se depositaram algumas expectativas na aromatização do azeite, pois possui maior quantidade de limoneno, mas como altera o índice de acidez, foi excluída. A casca de limão no nosso país de alguma forma já está ligada ao azeite, pois passa por uma “receita caseira”, como forma de tempero em determinadas refeições.

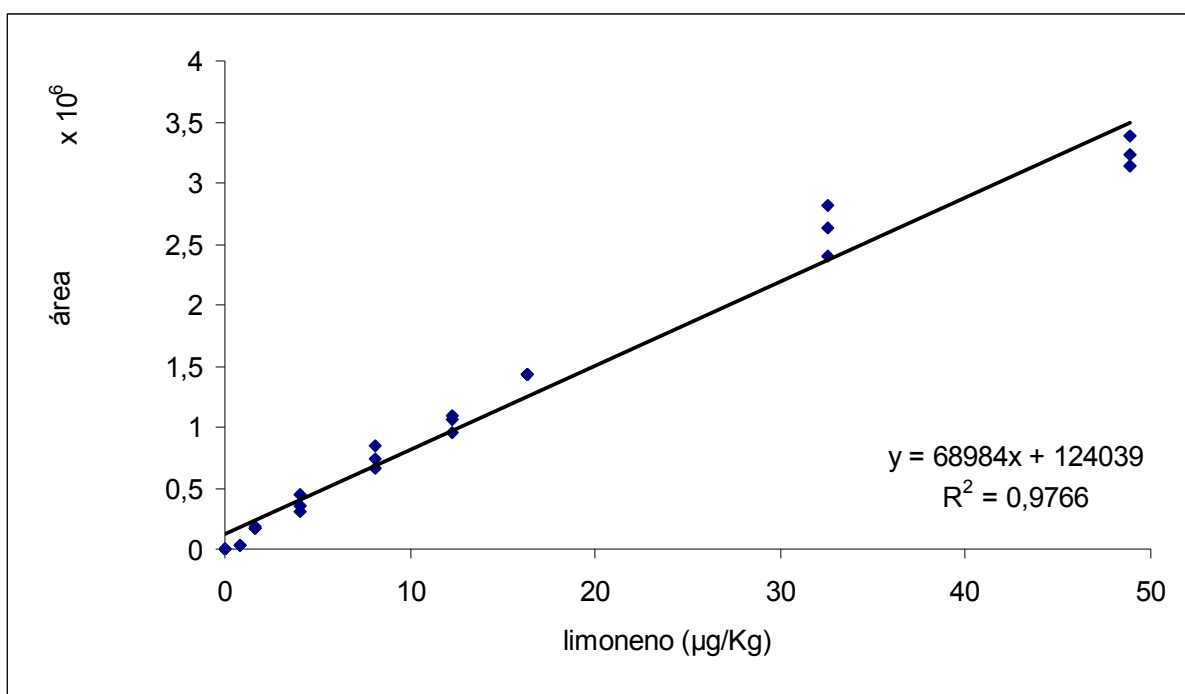
De salientar, que para todas as amostras foi realizado uma prova de análise sensorial não oficial, que consistiu em cheirar a amostra para identificar o aroma cítrico. Dos dez indivíduos postos à prova, todos eles identificaram o aroma cítrico do azeite em garrafa de vidro, sem contudo ter conseguido identificar o fruto.

Desta forma, o estudo prosseguiu apenas com a casca de limão para aromatizar azeite, pois é o componente que quando adicionado ao azeite não altera os seus valores de índice de acidez e de índice de peróxidos para valores fora dos parâmetros legais.

### 3- CURVA DE CALIBRAÇÃO DO LIMONENO

A curva de calibração traçada para a quantificação do limoneno em azeite permitirá a determinação da concentração de limoneno em azeite aromatizado com casca de limão.

À medida que as diluições iam sendo analisadas por SPME (três réplicas por diluição) observa-se o aumento do pico cromatográfico, com o tempo de retenção de  $\pm 3$  minutos. Apurados os valores de área de pico cromatográfico e respectivos tempos de retenção obtidos após injeção, procedeu-se à realização da curva de calibração de limoneno (Figura 17).



**Figura 17-** Curva de calibração obtida para o limoneno

A representação gráfica dos valores das áreas dos sinais cromatográficos em função da concentração do limoneno (Figura 17), permite verificar uma boa correlação linear ( $R^2=0,9766$ ) entre os referidos parâmetros.

A curva de calibração obtida serviu para quantificar a concentração de limoneno em todos os ensaios realizados com casca de limão.

### 4- ESTUDO DA ESTABILIDADE DO AZEITE AO LONGO DO TEMPO

O modo de preparação das amostras encontra-se descrito no Capítulo II – Preparação de Amostras.

Estudos anteriores mostraram que azeite armazenado em ambiente seco e fresco, em garrafa de vidro, sem luz directa, ou seja, reunindo as condições ideais de armazenamento, não sofrem alterações de índice de acidez (IA) e índice de peróxidos (IP) significativas ao longo de dois meses (resultados não publicados).

#### 4.1- Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

Neste azeite determinou-se o índice de acidez (Figura 18), o índice de peróxidos (Figura 19) e a quantidade de limoneno extraído (Figura 20), pelos respectivos métodos químicos e de extracção por SPME, por um período ao longo de 60 dias.

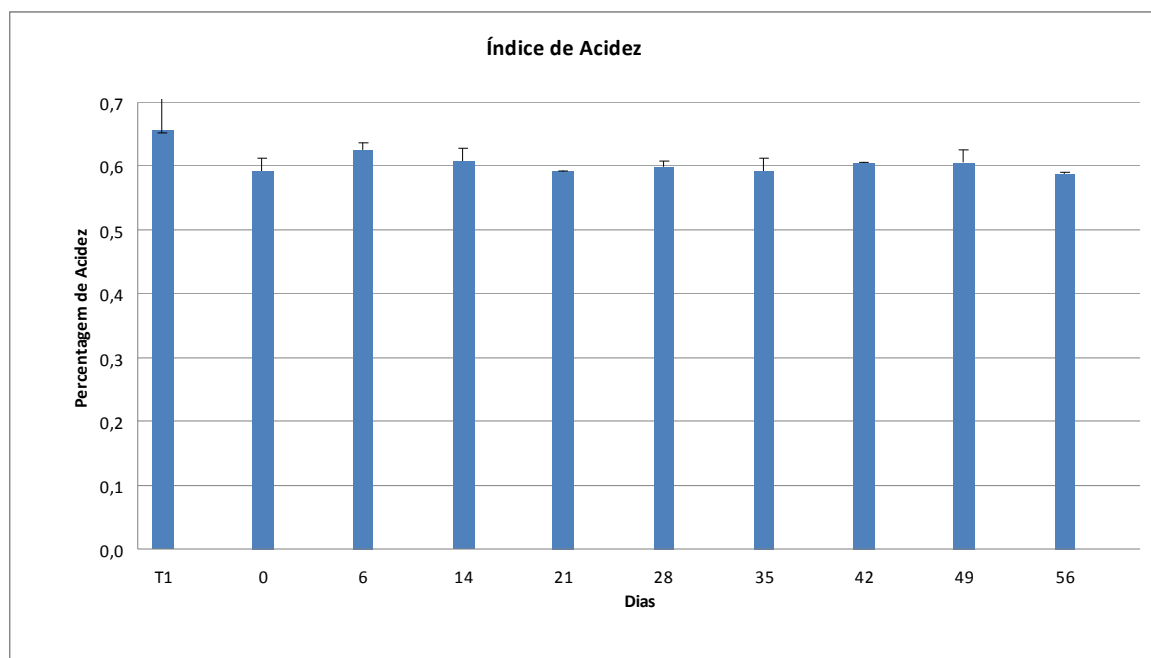
Foi realizada análise multivariada, para os dados de FTIR (Figura 21 e 22).

##### 4.1.1- Índice de Acidez

Na Tabela 8 estão apresentados os valores resultantes das determinações feitas para o índice de acidez, ao azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão.

**Tabela 8-** Resultados de determinações de índice de acidez, para azeites aromatizados com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão

AMOSTRA (Dias)	Í. ACIDEZ (%)	DESVIO PADRÃO
<b>T1</b>	0,65	0,09
<b>0</b>	0,59	0,02
<b>6</b>	0,63	0,01
<b>14</b>	0,61	0,02
<b>21</b>	0,59	0,00
<b>28</b>	0,60	0,01
<b>35</b>	0,59	0,02
<b>42</b>	0,61	0,00
<b>49</b>	0,61	0,02
<b>56</b>	0,59	0,02



**Figura 18-** Índice de Acidez do Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

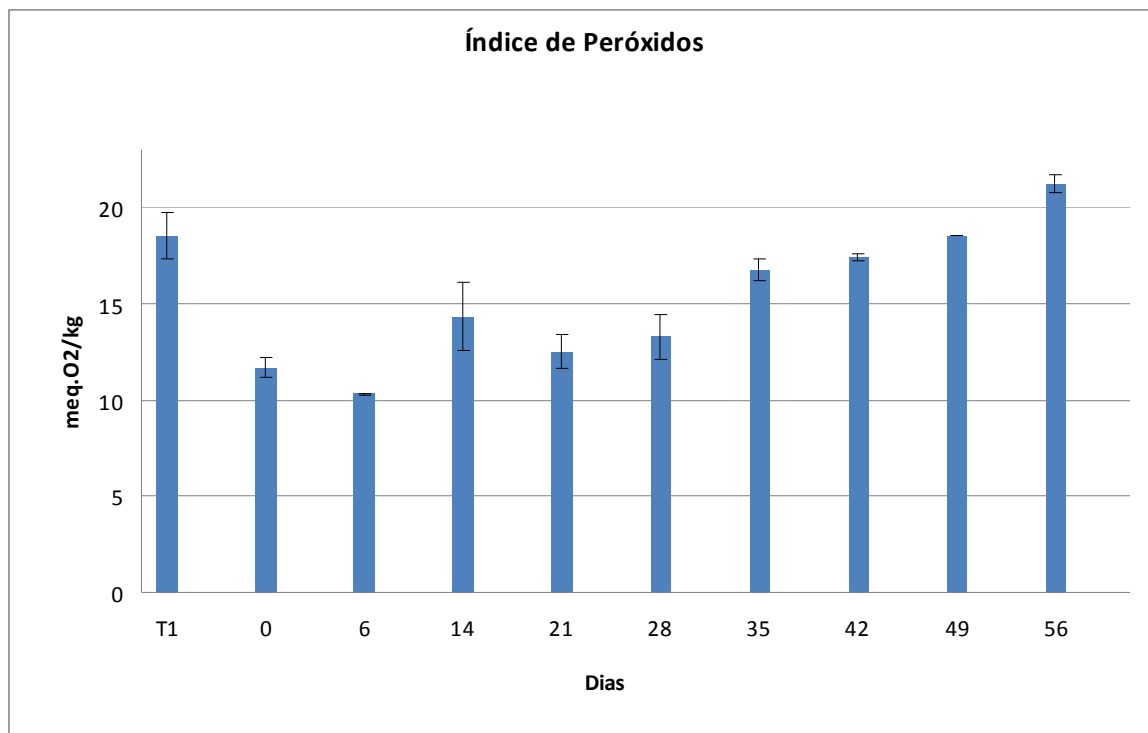
No gráfico apresentado na Figura 18 verifica-se que o índice de acidez do azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca, se mantém estável durante o período de análise (17 de Abril a 12 de Junho). Os valores obtidos nunca passaram o resultado do azeite testemunha (T1).

#### **4.1.2- Índice de Peróxidos**

Na Tabela 9 apresentam-se os valores resultantes das determinações feitas para o índice de peróxidos, ao azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão.

**Tabela 9-** Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão

<b>AMOSTRA (Dias)</b>	<b>Í. PERÓXIDOS (meq.O<sub>2</sub>/kg)</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
<b>T1</b>	18,54	1,23
<b>0</b>	11,69	0,47
<b>6</b>	10,30	0,02
<b>14</b>	14,36	1,78
<b>21</b>	12,52	0,87
<b>28</b>	13,30	1,15
<b>35</b>	16,79	0,54
<b>42</b>	17,45	0,19
<b>49</b>	18,54	0,03
<b>56</b>	21,25	0,48



**Figura 19-** Índice de Peróxidos do Azeite Aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

Na determinação do índice de peróxidos do azeite (Figura 19) aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, verificou-se alguma variação ao longo do tempo.

É de referir que aos 56 dias de aromatização este azeite passou os 20 meq.O<sub>2</sub>/kg, ou seja, já não é recomendado para consumo humano.

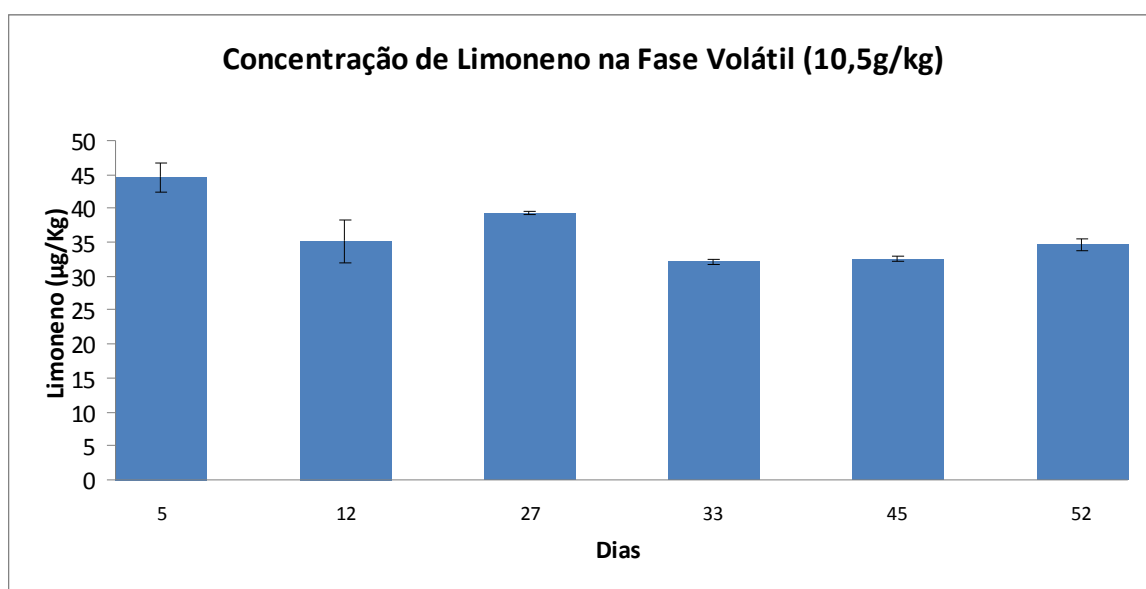
### 4.1.3- Concentração de Limoneno na Fase Volátil

Na Tabela n.º10 apresentam-se os valores resultantes das determinações feitas para a concentração de limoneno, ao azeite aromatizado com 10,5g/kg de casca de limão.



**Tabela 10-** Resultados da determinação da área de pico de limoneno

AMOSTRA (Dias)	ÁREA de PICO de LIMONENO (µg/kg)	DESVIO PADRÃO
5	44,61	2,17
12	35,17	3,12
27	39,33	0,28
33	32,11	0,26
45	32,57	0,33
52	34,73	0,86



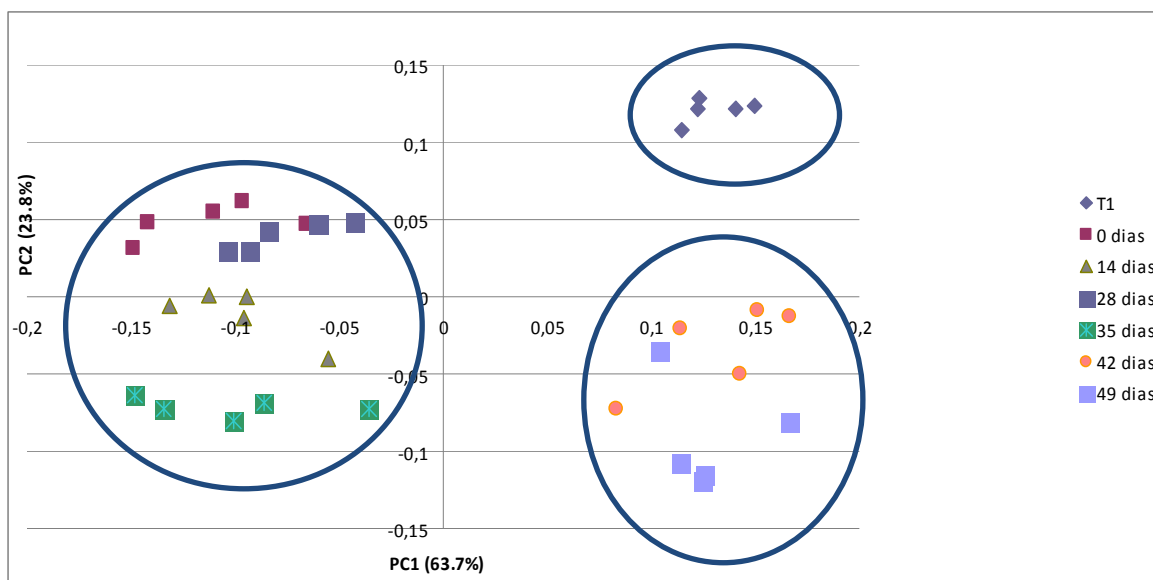
**Figura 20-** Concentração de limoneno na fase volátil do azeite aromatizado com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

Este azeite esteve em contacto com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão, apenas na primeira semana, daí o resultado da quantificação do limoneno ter sido a mais elevada (44,61µg/l) ( $\pm 2,17$ ). A decantação ao fim de 7 dias, pode ter originado perda de limoneno como se pode verificar na primeira amostra realizada após a retirada das cascas (12 dias após).

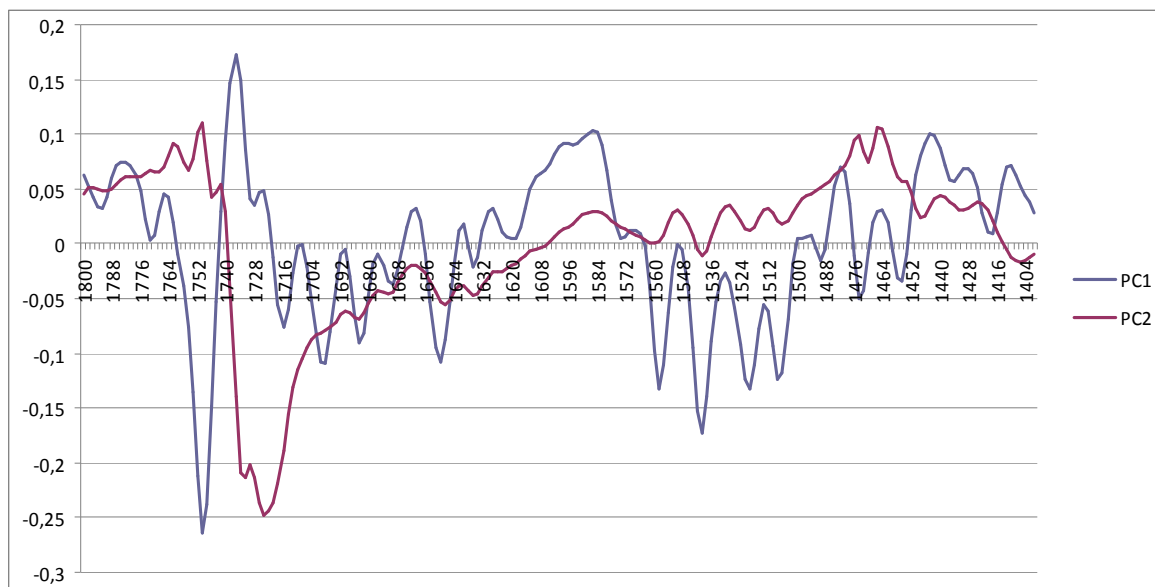
O objectivo deste estudo foi avaliar se a concentração de limoneno se perde ao longo do tempo. Nas semanas que se seguem à remoção das cascas, verifica-se alguma estabilidade no limoneno na fase volátil, ou seja, não tendo sido sentidas perdas significativas ao longo dos 60 dias que decorreu este estudo.

#### 4.1.4- Análise Multivariada

Esta análise apresenta contribuições factoriais entre 1800 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ , que ao serem analisadas como distâncias, serão encontradas as diferenças das amostras. É de salientar, que o número de pontos nas análises espectroscópicas é menor do que nas análises químicas, em virtude de faltarem os espectros de alguns dias.



**Figura 21-** Coordenadas factoriais relacionando a primeira com a segunda componente principal, para os dados do FTIR



**Figura 22-** Contribuições factoriais da primeira e da segunda componente principal, para os dados do FTIR

O PC1 explica 63,7% da variância total e apresenta contribuições factoriais positivas a  $1736\text{ cm}^{-1}$  e contribuições factoriais negativas a  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Figura 21 e 22). O PC2 explica 23,8% da variância total e apresenta contribuições factoriais positivas a  $1750\text{ cm}^{-1}$  e contribuições factoriais negativas a  $1722\text{ cm}^{-1}$  (Figura 21 e 22).

A amostra do azeite testemunha está no quadrante PC1 positivo e PC2 positivo, separadas de todas as amostras aromatizadas com 10,5g/kg de azeite, de casca de limão. As amostras analisadas até aos 35 dias de aromatização encontram-se no quadrante PC1 negativo e as amostras analisadas dos 42 aos 49 dias estão no quadrante PC1 positivo e PC2 negativo. A separação poderá estar relacionada com alterações do valor índice de peróxidos das amostras, que poderá estar a ser influenciado por reacções de peroxidação (ver Capítulo I, ponto 5- Oxidação de Ácidos Gordos e Formação de Compostos Voláteis no Azeite).

Esta separação evidenciada no PC1 pode estar relacionada com os valores determinados de índices de peróxidos, sendo que as amostras T1, 42 e 49 dias apresentam valores superiores aos restantes (0, 14, 28 e 35 dias).

#### **4.2- Azeite Aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias**

Neste azeite determinou-se o índice de acidez (Figura 23), o índice de peróxidos (Figura 24) e a quantidade de limoneno extraído (Figura 25), pelos respectivos métodos químicos. Foram ainda adquiridos espectros de FTIR ao longo de 60 dias. Foi aplicada análise multivariada para os dados de FTIR (Figura 26 e 27).

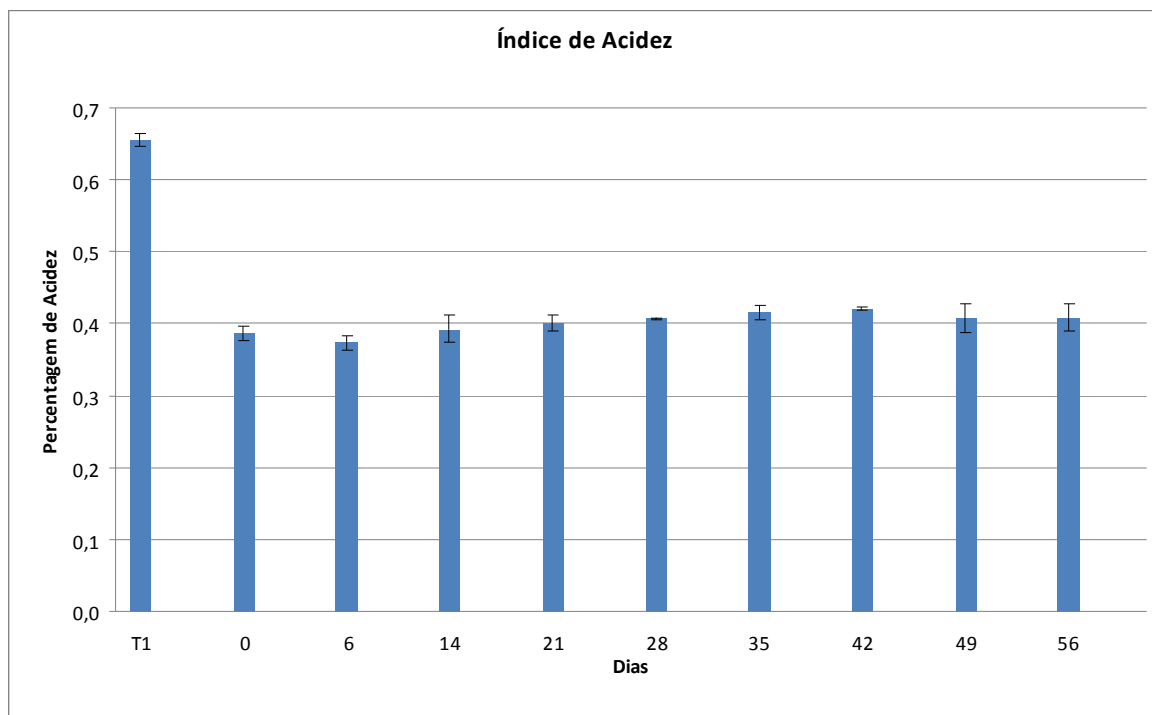
As cascas de limão colocadas na garrafa estiveram em contacto com o azeite durante todo o ensaio.

##### **4.2.1- Índice de Acidez**

Na Tabela 11 apresentam-se os valores resultantes das determinações feitas para o índice de acidez, ao azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão.

**Tabela 11-** Resultados de determinações de índice de acidez, para azeites aromatizados com 5g/kg de casca de limão

<b>AMOSTRA (Dias)</b>	<b>Í. ACIDEZ (%)</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
<b>T1</b>	0,65	0,01
<b>0</b>	0,39	0,01
<b>6</b>	0,37	0,01
<b>14</b>	0,39	0,02
<b>21</b>	0,40	0,01
<b>28</b>	0,41	0,00
<b>35</b>	0,42	0,01
<b>42</b>	0,42	0,00
<b>49</b>	0,41	0,02
<b>56</b>	0,41	0,02



**Figura 23-** Índice de Acidez do Azeite Aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

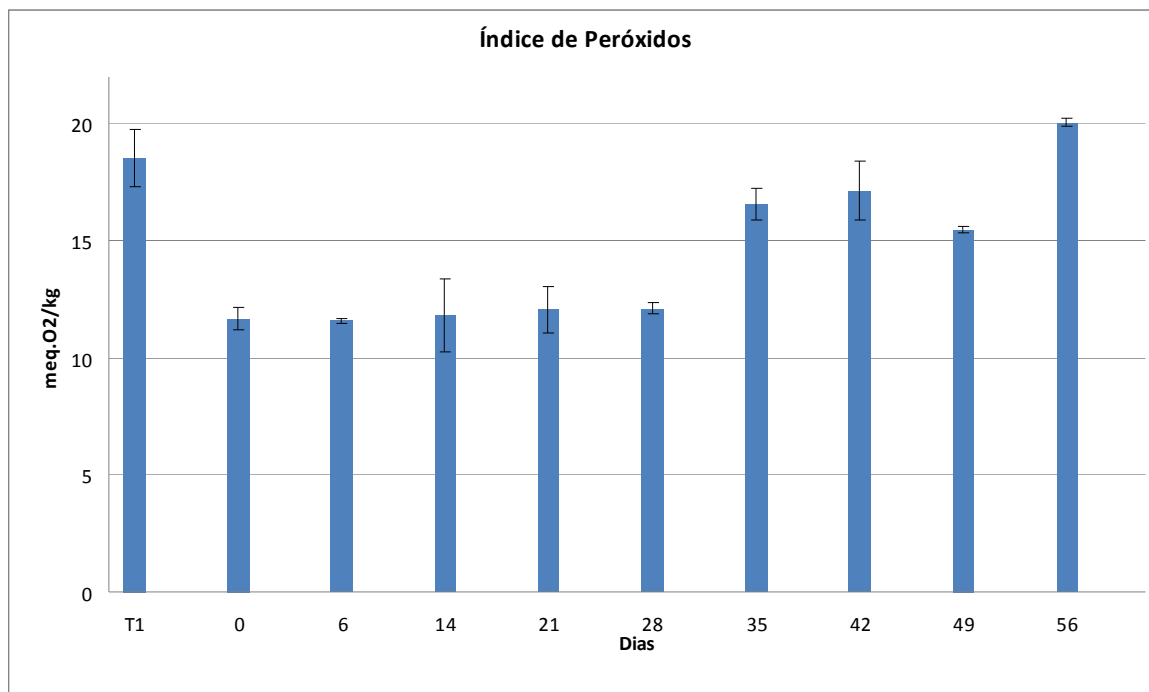
Na figura 23 pode observar-se que o índice de acidez se manteve estável ao longo de todo o ensaio. De salientar, que os resultados obtidos foram sempre abaixo do valor da amostra testemunha (T1).

### 4.2.2- Índice de Peróxidos

Na Tabela 12 estão apresentados os valores resultantes das determinações feitas para o índice de peróxidos, ao azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão.

**Tabela 12-** Resultados de determinações de índice de peróxidos, para azeites aromatizados com 5g/kg de azeite, de casca de limão

AMOSTRA (Dias)	Í. PERÓXIDOS (meq.O <sub>2</sub> /kg)	DESVIO PADRÃO
<b>T1</b>	18,54	1,23
<b>0</b>	11,69	0,47
<b>6</b>	11,58	0,08
<b>14</b>	11,81	1,55
<b>21</b>	12,07	0,97
<b>28</b>	12,11	0,24
<b>35</b>	16,56	0,67
<b>42</b>	17,13	1,25
<b>49</b>	15,47	0,14
<b>56</b>	20,06	0,14



**Figura 24-** Índice de Peróxidos do Azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

Neste ensaio, verifica-se alguma variação após o primeiro mês de análises, chegando mesmo aos 56 dias de aromatização, a atingir os 20 meq.O<sub>2</sub>/kg, ou seja, o azeite apresenta níveis de oxidação elevados, deixando de ser próprio para consumo humano. Durante o primeiro mês do ensaio, as cascas de limão deverão actuar como antioxidante, evidenciando uma diminuição do índice de peróxidos, em relação à amostra testemunha (T1). Este ensaio mostra resultados de índice de peróxidos similares aos do ensaio para índice de peróxidos do azeite aromatizado com 10,5 g/kg de azeite, de casca de limão.

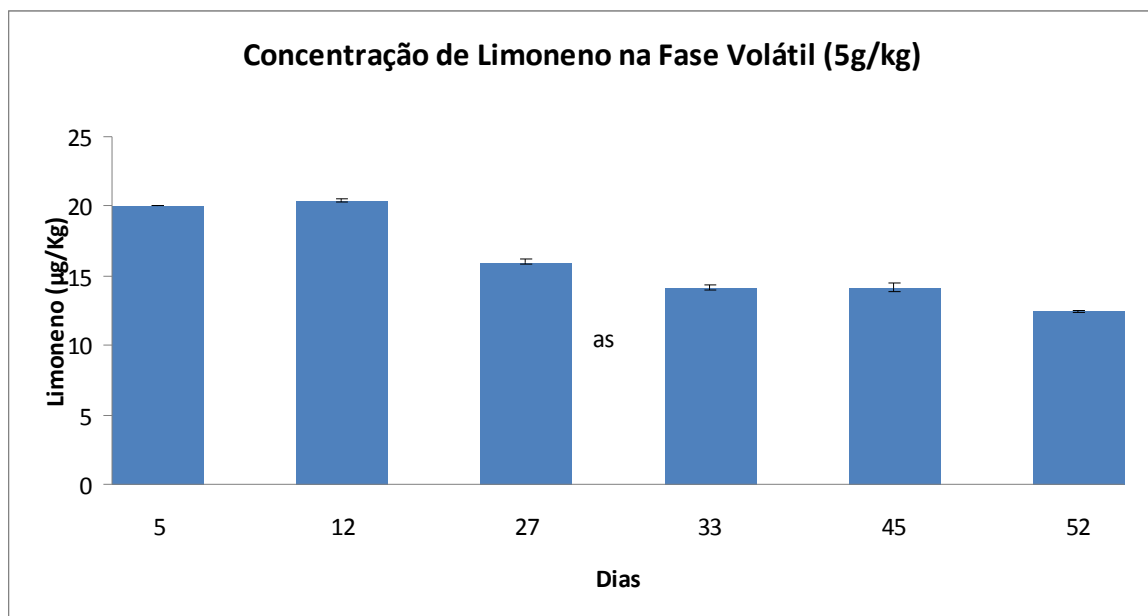
Uma forma de contornar o obstáculo do aumento do valor de índice de peróxidos, é a redução do tamanho da embalagem. O azeite aromatizado com casca de limão deverá ser comercializado numa embalagem reduzida, por exemplo numa apresentação de 250 mL, garantindo desta forma, que seria consumido pelo cliente, no prazo de um mês. Actualmente existem, nas prateleiras de azeite “gourmet”, embalagem de volume reduzido, deixando-se de parte a convencional apresentação de 750 mL.

#### **4.2.3- Concentração de Limoneno na Fase Volátil**

Na Tabela 13 apresentam-se os valores resultantes das determinações feitas para a quantificação de limoneno, no azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão.

**Tabela 13-** Resultados da determinação da área de pico de limoneno

<b>AMOSTRA (Dias)</b>	<b>ÁREA de PICO de LIMONENO (µg/kg)</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
<b>5</b>	20,00	0,01
<b>12</b>	20,41	0,10
<b>27</b>	16,01	0,21
<b>33</b>	14,14	0,16
<b>45</b>	14,12	0,31
<b>52</b>	12,47	0,10



**Figura 25-** Concentração de limoneno na fase volátil do azeite aromatizado com 5g/kg de azeite, de casca de limão, ao longo de 60 dias

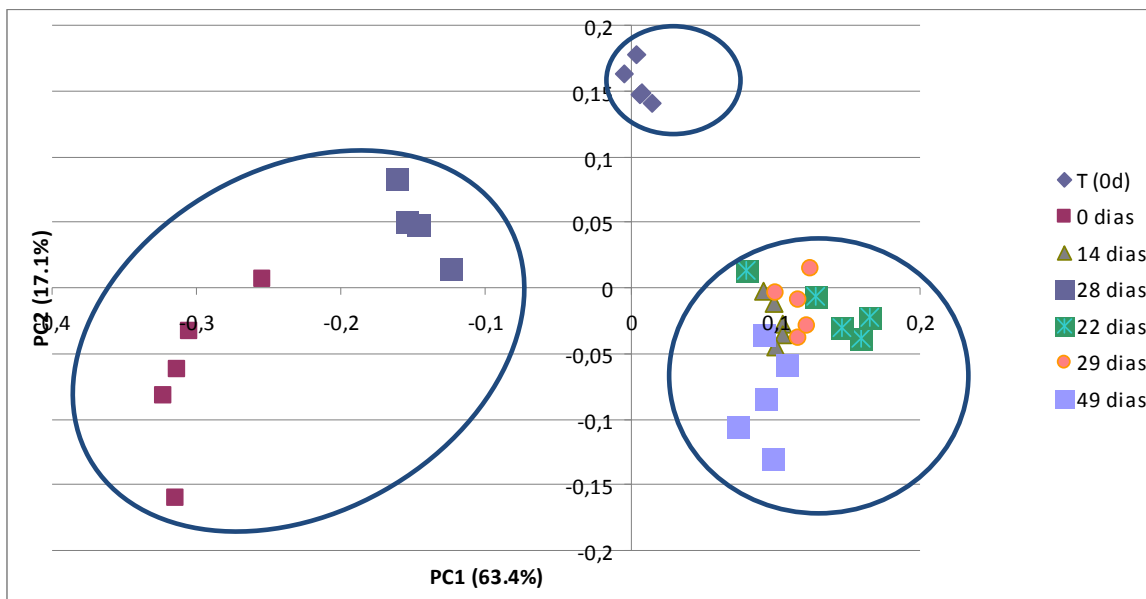
Com esta quantificação, pretende-se avaliar se há aumento da concentração do limoneno ao longo de 60 dias (Figura 25). A concentração de limoneno na fase volátil mais elevada verificou-se nos dias 22 e 29 de Abril, sendo esta, a fase inicial do estudo.

Após esta fase inicial, a quantidade de limoneno, na fase volátil, tende a diminuir gradualmente até ao final do ensaio.

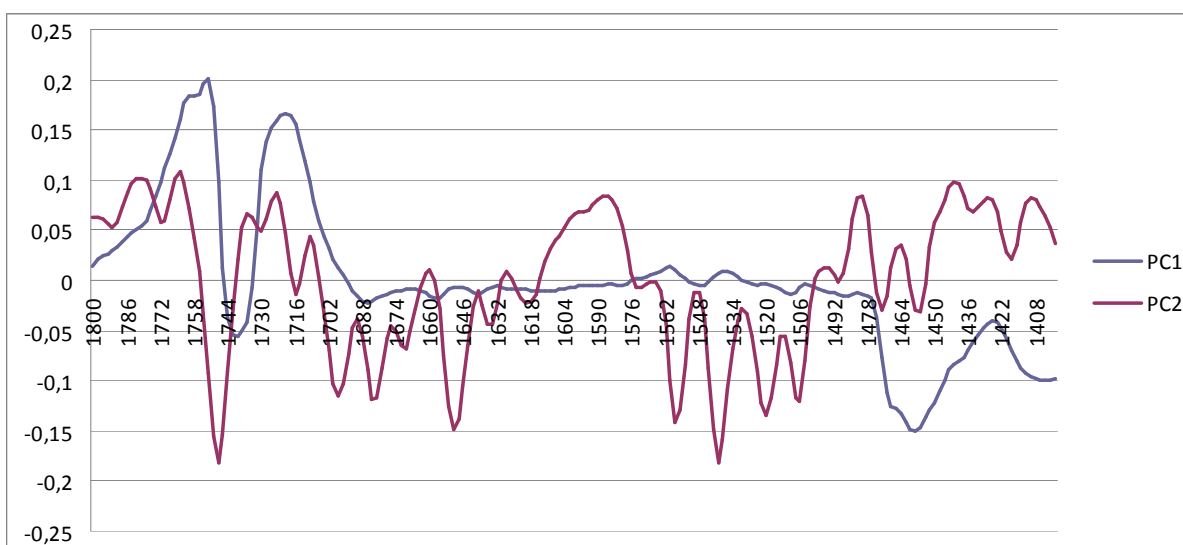
#### 4.2.4- Análise Multivariada

Para este estudo, o número de pontos também é inferior nas análises espectroscópicas do que nas análises químicas, devido à ausência dos espectros de alguns dias.





**Figura 26-** Coordenadas factoriais relacionando a primeira com a segunda componente principal, para os dados do FTIR



**Figura 27-** Contribuições factoriais da primeira e da segunda componente principal, para os dados do FTIR

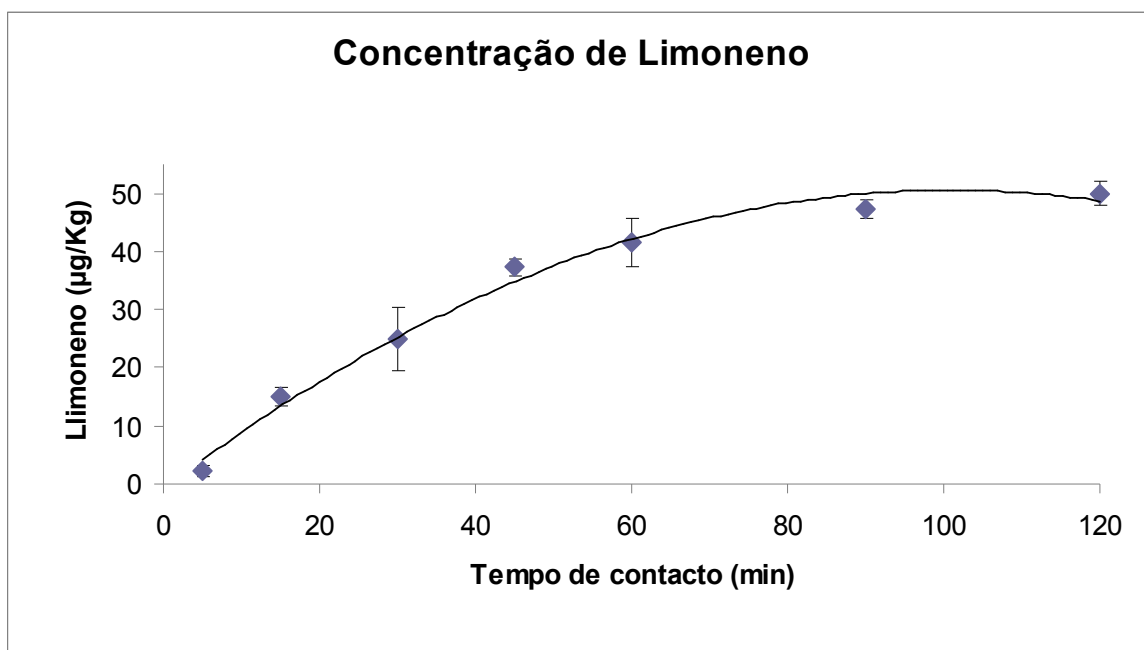
O PC1 explica 63,4% da variância total e apresenta contribuições factoriais positivas a 1752 e 1718  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 26 e 27), enquanto que o PC2 explica 17,1% da variância total e apresenta contribuições factoriais positivas a 1762 e 1724  $\text{cm}^{-1}$  e contribuições factoriais negativas a 1748  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 26 e 27).

Observa-se bem a separação das amostras em três grupos, reflectindo o processo de alteração da amostra ao longo do tempo. A amostra do azeite testemunha está na parte positiva e bem separada das restantes amostras. As amostras analisadas até aos 35 dias estão separadas das amostras analisadas dos 42 aos 49 dias.

## **5- ESTUDO DA EXTRACÇÃO DO LIMONENO PARA O AZEITE À PRESSÃO ATMOSFÉRICA**

A extracção de limoneno à pressão atmosférica foi feita em função do tempo de contacto casca de limão - azeite, ou seja, adicionou-se, aproximadamente 0,5g de casca de limão a 35 mL de azeite e fez-se variar os tempos de contacto em 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

Analizando os picos cromatográficos e os respectivos tempos de retenção, determinaram-se as áreas e recorrendo à curva de calibração previamente traçada, foi quantificado o limoneno nas amostras. Na figura seguinte (Figura 28) está apresentada a concentração de limoneno extraído em função do tempo de contacto.



**Figura 28-** Curva de extracção de limoneno à pressão atmosférica

Analisando esta curva de extracção de limoneno à pressão atmosférica (Figura 28) verifica-se que o equilíbrio foi alcançado em cerca de 90 minutos de contacto, tendo-se extraído 47,4µg/kg. Este valor é muito similar ao da extracção do ensaio do azeite aromatizado com 10,5 g/kg de azeite, de casca de limão, que após 5 dias apresenta uma quantidade de limoneno de 44,61 µg/kg. Esta relação poderá indicar que existe um ponto de saturação na extracção do limoneno.

### 6- UTILIZAÇÃO DA ALTA PRESSÃO NA EXTRACÇÃO DE LIMONENO

A utilização da alta pressão para extracção de limoneno no azeite revela-se uma metodologia inovadora. Com a finalidade de estudar o efeito do tempo e da pressurização na extracção de limoneno, foram escolhidas três pressões: 100, 200 e 300MPa durante 5 e 15 minutos.

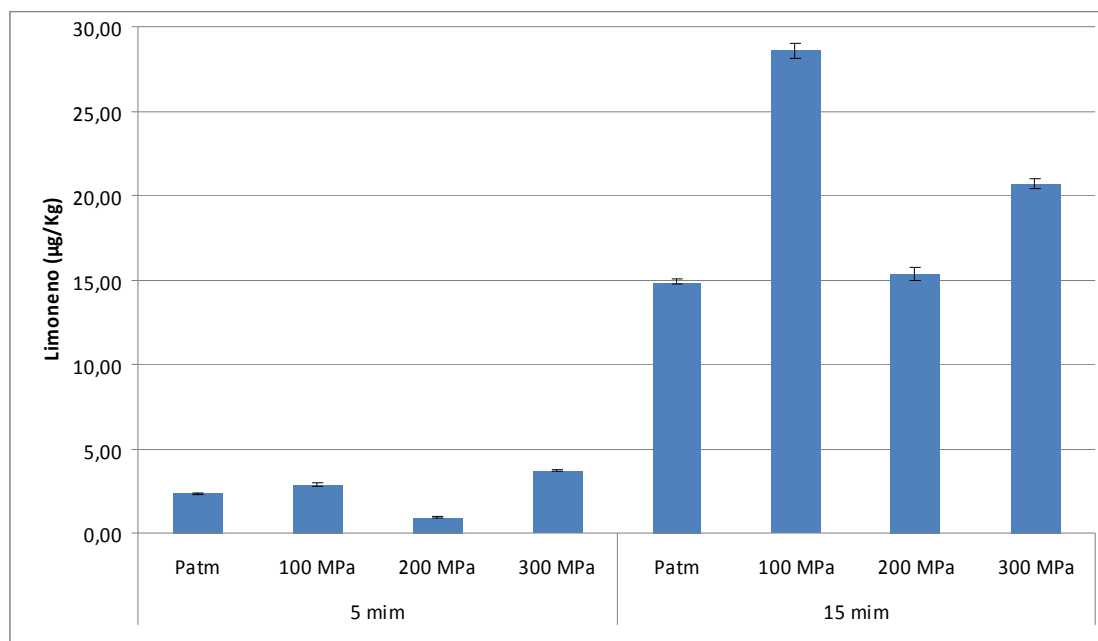
Para a preparação das amostras: adicionou-se, aproximadamente 0,5g de casca de limão a 35 mL de azeite, em frascos (procedimento descrito no ponto 7, no Capítulo II – Preparação de Amostras). Adicionalmente foram preparadas amostras controlo à pressão atmosférica (Patm), com 5 e 15 minutos de contacto, de modo a serem utilizadas como termo de comparação do efeito de AP no processo de extracção. Estas amostras foram preparadas da mesma forma e ao mesmo tempo que as amostras a pressurizar.

Para cada ensaio de extracção, foram realizadas as respectivas réplicas (2) para extracção por SPME/GC-FID. Na Tabela 14 estão representados os valores da área de pico do limoneno, presentes nas amostras de azeite pressurizadas a 100, 200 e 300 MPa, durante 5 e 15 minutos.

**Tabela 14-** Resultados das áreas de pico de limoneno pressurizadas a 100, 200 e 300 MPa, durante 5 e 15 minutos

AMOSTRA	LIMONENO ( $\mu\text{g/kg}$ )	DESVIO PADRÃO	TEMPO AP (min)
Patm	2,33	0,03	5
100MPa	2,87	0,11	
200MPa	0,91	0,07	
300MPa	3,70	0,04	
Patm	14,87	0,13	15
100MPa	28,57	0,45	
200MPa	15,34	0,37	
300MPa	20,66	0,29	

Na Figura 29 podem observar-se resultados da concentração de limoneno presente nas amostras de azeite pressurizadas a 100, 200 e 300 MPa, durante 5 e 15 minutos.



**Figura 29-** Concentração de limoneno presente em amostras de azeite pressurizadas a 100, 200 e 300MPa, durante 5 e 15 minutos

No ensaio com duração de 5 minutos, os valores mostram-se muito próximos uns dos outros, conseguindo-se extrair uma concentração de limoneno máxima de 3,73µg/kg a 300MPa.

No ensaio de 15 minutos verificou-se que todas as amostras pressurizadas apresentam uma concentração de limoneno extraído mais elevado que a respectiva amostra não pressurizada, ou seja, conseguiu-se extrair mais limoneno para o azeite. Isto poderá ser devido ao facto de que durante o processo de AP, houve um aumento de permeabilidade das células da casca de limão, levando à entrada de azeite mais facilmente e daí maior acessibilidade, maior solubilização e consequente extracção do limoneno (Santos, 2009). No ensaio de 15 minutos, conseguiu extrair-se quase 30µg/kg a 100MPa, ou seja, quase o dobro da quantidade extraída à pressão atmosférica ( $P_{atm}$ ) para o mesmo tempo. Contudo, este valor é inferior ao atingido no ensaio anterior, obtido à pressão atmosférica, em que o ponto de equilíbrio foi alcançado em cerca de 90 minutos, tendo sido extraído 47,4 µg/kg de limoneno (Capítulo IV – 5).

Contrariamente ao referido por Zhang *et al.* (2006) num ensaio de extracção de componentes bio-activos da *Rhodiola sachalinensis* com AP, por Xi *et al.* (2006) sobre extracção de licopeno de resíduos de pasta de tomate com AP e por Zhang *et al.* (2005) acerca da extracção de ginsenosídeos a partir da planta *Panax quinquefolium* com AP, que os melhores resultados de extracção de limoneno não foram obtidos com tempos de pressurização baixos (entre 1 e 5 minutos), neste ensaio pode concluir-se que o tempo de pressurização de 15 minutos é, de entre os tempos de pressurização testados o mais adequado para extrair limoneno do azeite. Convém salientar que o solvente de extracção utilizado nos ensaios referidos é distinto, sendo uma solução à base de etanol, que poderá ir de 50 a 75%.

### 6.1- Utilização da AP na Extracção com Saco

Visto o vaso de pressão ter uma dimensão reduzida, o objectivo deste ensaio passa por reduzir o volume da amostra a pressurizar, para tal a amostra foi pressurizada num saco (Capítulo II.7 – Preparação de Amostras) em 5 mL de azeite, pois os frascos são maiores e possuem uma capacidade de 35 mL.

Após pressurização (100 MPa, 15 minutos) o volume do saco perfeitou-se com 30 mL de azeite, num frasco e de seguida a amostra foi homogeneizada.

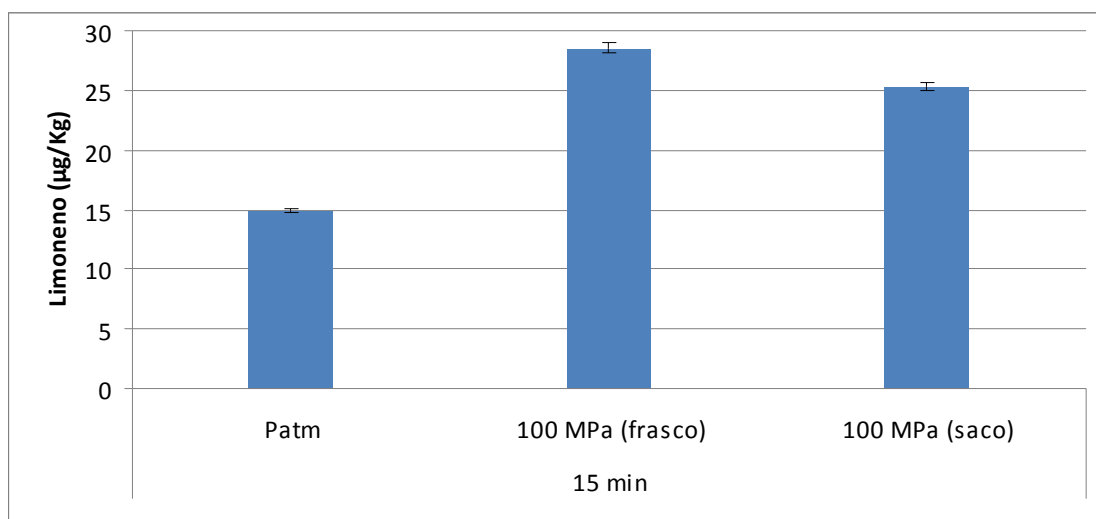
Foi realizada uma amostra controlo à pressão atmosférica (Patm), ao mesmo tempo e usando as mesmas proporções que a amostra submetida a Alta Pressão: tempo de contacto 15 minutos, 0,5g de casca de limão e 5 mL de azeite, a 100 MPa. Após extracção, o volume, perfeitou-se com 30 mL de azeite, num frasco para ser posteriormente homogeneizado. Após cada ensaio, foram preparadas as respectivas réplicas para SPME/GC-FID.

Na Tabela 15 estão representados os valores da área de pico do limoneno presente nas amostras de azeite pressurizadas a 100 MPa durante 15 minutos.

**Tabela 15-** Resultados das áreas de pico de limoneno pressurizadas a 100 MPa, durante 15 minutos, em saco comparativamente ao frasco

AMOSTRA	LIMONENO (µg/kg)	DESVIO PADRÃO
Patm	14,87	0,13
100 MPa (frasco)	28,57	0,45
100 MPa (saco)	25,34	0,37

A Figura 30 representa a concentração de limoneno extraído das amostras de azeite, podendo ser comparados valores obtidos por extracção em saco e em frasco.



**Figura 30-** Concentração de limoneno presente em amostras de azeite, em saco comparativamente ao frasco

Pela análise da Figura 30, verifica-se que com as amostras pressurizadas obteve-se maior quantidade de limoneno, do que à pressão atmosféricas ( $P_{atm}$ ), ou seja, conseguiu-se extrair limoneno para o azeite.

Comparando as pressurizações com frasco e com saco, conclui-se que os valores resultantes do saco são ligeiramente mais baixos que os resultantes do frasco, para 15 minutos a 100MPa. Em termos industriais, a escolha do saco, poderia ser mais vantajosa em termos de custos finais (maior número de amostras tratadas por pressurização e por hora) e de acondicionamento (o uso do frasco envolve custos elevados devido a preço de frasco e tampas compatíveis com ensaios para AP).

## **6.2- Variação da Concentração de Limoneno com a Quantidade de Casca de Limão**

Neste ensaio, pretende-se avaliar qual a quantidade de casca de limão, a partir da qual com a mesma quantidade de azeite se extrai a mesma quantidade de limoneno.

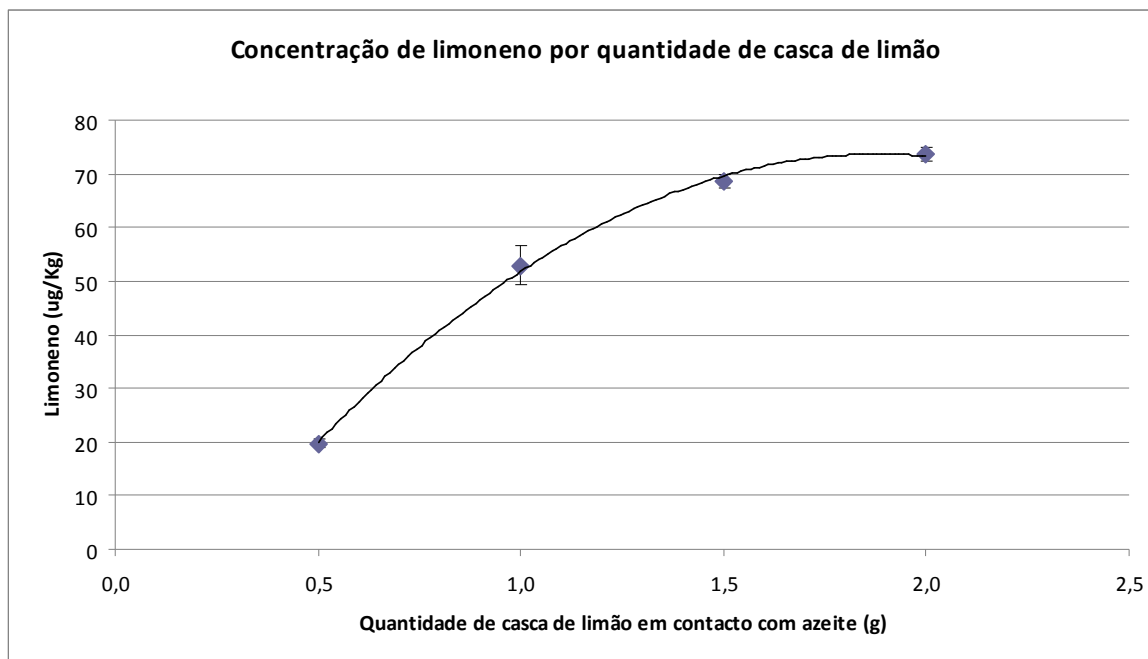
As amostras foram preparadas conforme descrito no ponto 7 do Capítulo II – Preparação de Amostras, tendo sido sujeitas a pressurização a 100 MPa, durante 15 minutos num saco.

A Tabela 16 apresenta os valores resultantes da AP para as amostras realizadas.

**Tabela 16-** Concentração de limoneno por quantidade de casca de limão para 5 ml de azeite

<b>CASCA de LIMÃO (g)</b>	<b>LIMONENO (<math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
<b>0,5</b>	19,65	0,78
<b>1</b>	52,90	3,68
<b>1,5</b>	68,55	1,34
<b>2</b>	73,65	1,20

A Figura 31 representa a concentração de limoneno presente nas diferentes quantidades de casca de limão. As mostras foram pressurizadas a 100 MPa durante 15 minutos.



**Figura 31-** Concentração de limoneno por quantidade de casca de limão, a 100 MPa, durante 15 minutos, em saco

Na Figura 31 pode verificar-se que, de 0,5g de casca de limão até 1,5g a concentração de limoneno extraída sobe de forma gradual e que a partir de 1,5g de casca de limão se começa a atingir o ponto de equilíbrio de extracção de limoneno. Em termos industriais, pode-se tornar vantajoso, pois pode ajustar-se a quantidade de matéria-prima para extracção, diminuindo custos.

Neste caso, conseguiu-se uma maior extractabilidade do limoneno para o azeite do que à pressão atmosférica, tendo em conta que a quantidade de limoneno extraída estava num volume de, apenas, 5 mL.



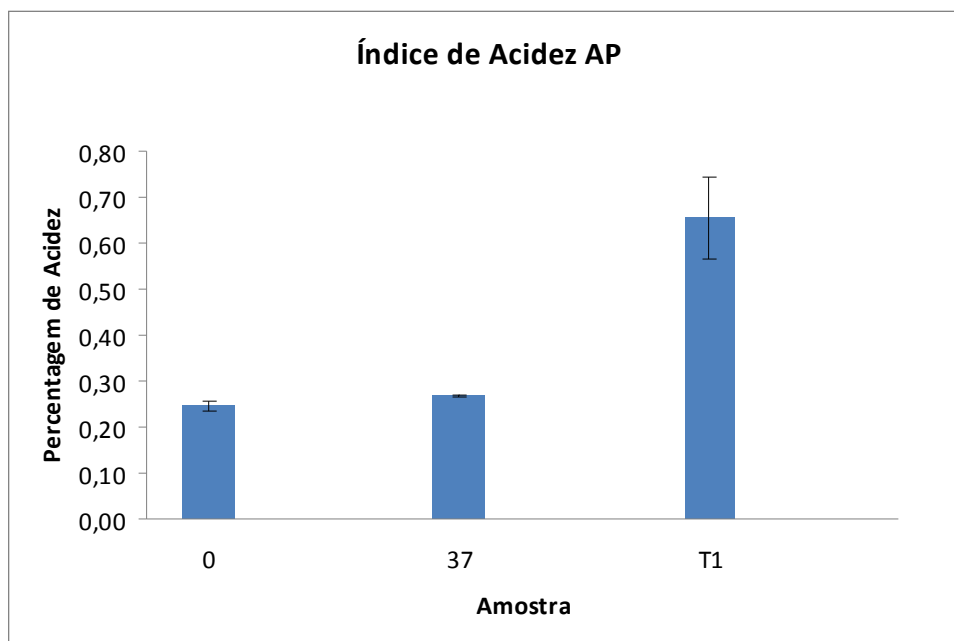
### 6.3- Índice de Acidez

Na Tabela 17 estão apresentados os valores resultantes da determinação do índice de acidez para um azeite aromatizado com casca de limão, submetido a AP, durante 15 minutos a 100 MPa.

**Tabela 17-** Resultados das determinações do índice de acidez para um azeite submetido a AP (100MPa, durante 15 minutos)

AMOSTRA (Dias)	ÍNDICE de ACIDEZ (%)	DESVIO PADRÃO
<b>T1</b>	0,65	0,09
<b>0</b>	0,25	0,01
<b>37</b>	0,27	0,00

O índice de acidez do azeite sujeito a AP, foi determinado pelo método químico referido no ponto 1, no Capítulo III – Metodologia Aplicada e comparou-se com o azeite testemunha (T1)



**Figura 32-** Índice de Acidez para amostra de azeite aromatizado, sujeito a pressurização

Na determinação do índice de acidez para uma amostra de azeite aromatizado com casca de limão, sujeito a AP, verificou-se que o índice de acidez está dentro dos valores tidos como regulamentados, abaixo do azeite testemunha (T1) e menor que ensaios realizados à pressão atmosférica. Isto pode significar que qualquer que seja o efeito (poderá ser de simples neutralização) está a aumentar com a AP.

Passados 37 dias, procedeu-se novamente à determinação do índice de acidez para a mesma amostra, obtendo-se um resultado ligeiramente superior ao primeiro.

#### **6.4- Índice de Peróxidos**

A Tabela 18 apresenta os valores resultantes da determinação do índice de peróxidos para um azeite aromatizado com casca de limão, submetido a AP, durante 15 minutos a 100 MPa.

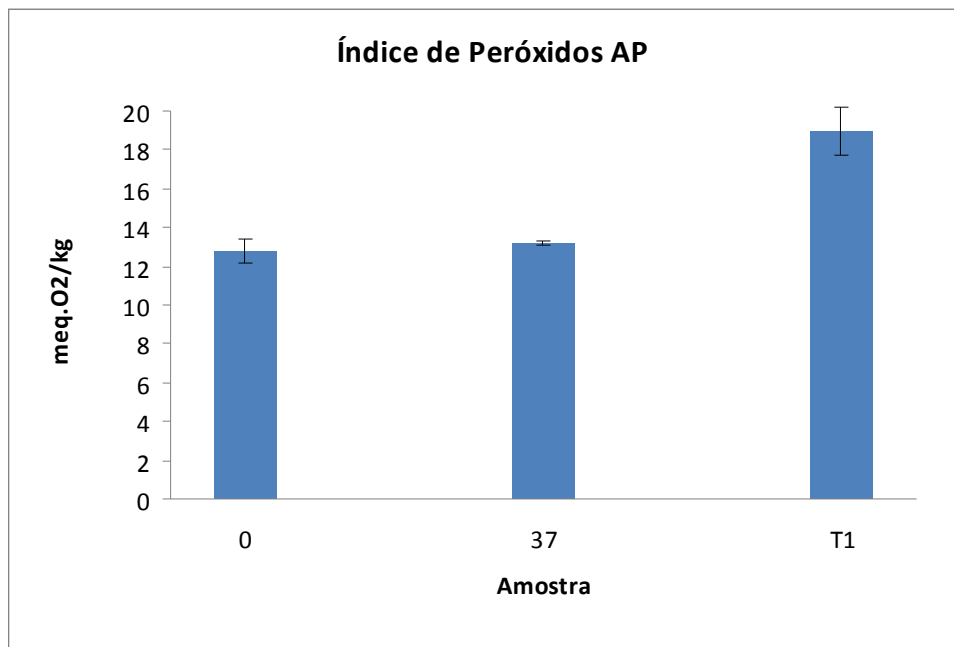
**Tabela 18-** Resultados das determinações do índice de peróxidos para um azeite submetido a AP (100MPa, durante 15 minutos)

<b>AMOSTRA (Dias)</b>	<b>ÍNDICE de PERÓXIDOS (meq.O<sub>2</sub>/kg))</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
<b>T1</b>	18,95	1,23
<b>0</b>	12,78	0,66
<b>37</b>	13,19	0,08

Determinou-se o Índice de Peróxidos (Figura 33) do azeite sujeito a AP, pelo método químico referido no ponto 2, no Capítulo III – Metodologia Aplicada e comparou-se com a amostra do azeite testemunha (T1).

Na determinação do índice de peróxidos para uma amostra de azeite aromatizado com casca de limão, sujeito a AP, obteve-se o resultado de 12,78meq.O<sub>2</sub>/kg, valor, dentro dos valores tidos como regulamentados e abaixo do indicado no rótulo da embalagem (20meq.O<sub>2</sub>/kg).

O valor do índice de peróxidos após 37 dias da pressurização é inferior aos valores obtidos aos 35 dias à pressão atmosférica, para o azeite aromatizado com 10,5 g/kg e 5g/kg de azeite, de casca de limão 16,79 e 16,56 meq.O<sub>2</sub>/kg, respectivamente.



**Figura 33-** Índice de Peróxidos para amostra de azeite aromatizado, sujeito a pressurização

Passados 37 dias, procedeu-se à determinação do índice de peróxidos para a mesma amostra, obtendo-se um resultado ligeiramente superior ao do inicial.

## **7- AZEITE INTENSAMENTE AROMATIZADO COM LIMONENO DA CASCA DE LIMÃO**

Foi preparada uma amostra, descrita no ponto 6 do Capítulo II – Preparação das Amostras, em que 20 mL de azeite foram intensamente aromatizados com a casca de um limão inteiro, aproximadamente 8,55g.

Ao fim de 3 horas à pressão atmosférica, as cascas foram separadas e 1 mL deste azeite foi diluído em 35 mL de azeite de garrafa.

Esta amostra apresentou um valor de extracção de 13,26 µg/kg de limoneno (média), para 1mL de azeite.

Tentando quantificar o pico de limoneno da amostra inicial, de 20 mL, chega-se à conclusão que foi extraído da casca de um limão (8,55g) o valor de 265,20 µg/kg.

A preparação de um azeite muito aromatizado com limoneno da casca de limão permite uma posterior preparação de diluições para ajustar a quantidade final desejada.

Este procedimento pode-se sugerir como alternativa industrial à preparação de azeite aromatizado, na medida em que, desta forma se evita o contacto do azeite com as cascas de limão dando outra apresentação ao produto final e podendo estabilizar o índice de peróxidos.



### CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

Na avaliação da possibilidade de aromatização do azeite com laranja, limão e tangerina, sob a forma de casca partida e de óleo extraído da casca verificou-se que a análise de componentes principais (PCA) aplicada aos dados dos espectros de NIR, permitiu apurar que apenas a casca de limão e a casca de laranja poderiam induzir alterações no azeite a aromatizar. A determinação do índice de acidez, permitiu eliminar a aromatização com casca de tangerina e casca de laranja, por aumentarem a acidez. Nenhuma das amostras apresentou alteração significativa do índice de peróxidos. Assim o estudo prosseguiu com a casca de limão para aromatizar azeite, esta forma de aromatização já existente na cultura mediterrânica sendo utilizada em diversas receitas.

A casca da laranja foi um aromatizante no qual se depositaram algumas expectativas para aromatização do azeite, por possuir maior quantidade de limoneno, no entanto a sua presença altera o índice de acidez, tendo sido excluída.

Foi realizado um estudo de estabilidade do azeite aromatizado, ao longo de 60 dias, tendo como base o acompanhamento de duas amostras: uma aromatizada com 10,5g/kg de casca de limão, à qual foram retiradas as cascas após 7 dias de contacto e a outra com 5g/kg de casca de limão que permaneceu sempre em contacto com as cascas. Verificou-se que o índice de acidez, de ambas as amostras, se manteve estável ao longo de todo o estudo dentro do valor obtido para o azeite testemunha (0,65% de acidez). No entanto o índice de peróxidos sofreu variação ao longo do tempo atingindo, no final do estudo, valores muito acima dos valores regulamentados (20meq.O<sub>2</sub>/kg) m. A quantidade de limoneno extraída revela valores, sem oscilações significativas, não tendo sido portanto registadas perdas ao longo de 60 dias.

O PCA aplicado aos espectros de FTIR destas amostras permitiu classificar o azeite aromatizado em amostras com um mês e com mais de um mês, reflectindo os valores de índice de peróxidos determinados. Para ultrapassar esta alteração detectada no azeite aromatizado sugere-se a comercialização em embalagens de volume reduzido, como por exemplo de 250 mL.

O estudo da extracção do limoneno para o azeite à pressão atmosférica, quantificado por SPME, permitiu concluir que o equilíbrio de extracção foi alcançado em cerca de 90 minutos de contacto, com 47,4 µg/kg.

## Conclusões

A utilização da Alta Pressão na extracção de limoneno permitiu obter um teor de limoneno mais elevado do que as não pressurizadas. Os valores de extracção mais elevados foram obtidos a 15 minutos e a 100 MPa ( $\pm 30 \mu\text{g/kg}$ ), sendo quase o dobro da quantidade extraída à pressão atmosférica. Em termos industriais esta tecnologia poderá ser muito vantajosa, pois com um método atérmico, obtém-se um azeite com completa retenção de nutrientes sem diminuição de validade, redução de tempo no processo de extracção, retenção de sabor, textura e cor. Os ensaios da extracção por Alta Pressão em saco, realizados com o intuito de reduzir a quantidade de azeite envolvida na extracção reduzindo consequentemente o volume das amostras a pressurizar, foram comparados com os resultados obtidos com pressurização em frasco, concluindo-se que os valores resultantes são similares, para 15 minutos a 100 MPa. Assumindo os 15 minutos de pressurização a 100 MPa como as melhores condições de extracção a Alta Pressão, foi realizado um ensaio que permitiu avaliar a quantidade de casca de limão a partir da qual, mantendo-se a quantidade de azeite, se atinge o equilíbrio de extracção. Concluiu-se que o equilíbrio foi atingido a 1,5g de casca de limão em 5 mL de azeite, o que em termos industriais permite a redução de aquisição de matéria-prima (casca de limão) utilizada. Os valores do índice de acidez e índice de peróxidos para o azeite tratado com Alta Pressão encontram-se dentro do que está legislado, no entanto, deve ser verificado o que acontece com o nível de ácidos gordos livres, procedendo-se à sua quantificação. Com este trabalho comprovou-se a viabilidade da aromatização de azeite com casca de limão preparando uma amostra de azeite intensamente aromatizado com limoneno de casca de limão, que possa ser usada diluída, podendo ajustando-se a quantidade de limoneno desejada e não necessitando de todo o azeite de estar em contacto com cascas de limão, podendo estabilizar-se o índice de peróxidos. Este procedimento sugere-se como alternativa industrial à Alta Pressão.

## BIBLIOGRAFIA

**Aparício, R.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I e Morales, M. T. (2000).** “Detection os rancid defect in virgin olive oil by electronic nose”. Journal Agriculture Food Chemistry. 48. Pág. 853-860.

**Aragão, L. (2005).** “Virgem Extra impulsiona Azeite”.  
[http://www.hipersuper.pt/2005/10/07/virgem\\_extra\\_impulsiona\\_azeite/](http://www.hipersuper.pt/2005/10/07/virgem_extra_impulsiona_azeite/). 24/Fevereiro/2010.

**Azimuth7 (2007).** “Métodos de extracção de óleos essenciais”.  
<http://pt.shvoong.com/medicine-and-health/859383-m%C3%A9todos-extra%C3%A7%C3%A3o-%C3%B3leos-essenciais>. 20/Fevereiro/2010

**Baiano, A.; Gambacorta, G. e La Notte, E. (2010).** “Aromatization of olive oil”. Transworld Research Network. Pág. 1-29.

**Bi, H.; Zhang, S.; Liu, C. e Wang, C. (2007).** “High hydrostatic pressure extraction of Salidroside from *Rhodiola sachalinensis*”. Journal of Food Process Engineering. 32. Pág. 53-63.

**Bicas, J. L.; Barros, F. F. C.; Wagner, R.; Godoy, H. T. e Pastore, G. M. (2008).** “Optimization of R-(+)- $\alpha$ -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene”. Journal and Microbiology Biotechnology. 35. Pág. 1061-1070.

**Bondancia, T. (2009).** “Experimentos: Extracção de óleo vegetal por arraste de vapor”.<http://pontociencia.org.br/experimentos-interna.php?experimento=3388&extracao+de+oleo+vegetal+por+arraste+de+vapor>. 21/Fevereiro/2010

**Buckow, R. e Heinz, V. (2008).** “High pressure processing – a database of kinetic information”. Chemie Ingenieur Technik. 80. 8. Pág. 1081-1095.



**Calderón, J. (2009).** “Uma breve história do azeite”.

[http://pt.shvoong.com//humanities/h\\_history/1914045-uma-breve-hist%C3%B3ria-azeite/](http://pt.shvoong.com//humanities/h_history/1914045-uma-breve-hist%C3%B3ria-azeite/).  
20/Fevereiro/2010.

**Campos, F. P.; Dosualdo, G. L. e Cristianini, M. (2003).** “Utilização da tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos.” Brazilian Journal of Food Technology. 6. 2. Pág. 351-357.

**Carvalho, M. (2007).** “Tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos”. Curso de mestrado em tecnologia de alimentos da universidade federal do ceará. Pág. 1-15.  
[br.monografias.com/trabalhos2/alta-pressao/alta-pressao2.shtml](http://br.monografias.com/trabalhos2/alta-pressao/alta-pressao2.shtml). 10/Outubro/2010.

**Corrales, M.; Toepfl, S.; Butz, P.; Knorr, D. e Tauscher, B. (2007).** “Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison.” Innovative Food Science and Emerging Technologies. 9. Pág. 85-91.

**Cunha, S. C. (2007).** “Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas”. Dissertação de Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Pág. 17-23.

**Custódio, T. A. (2009).** “Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos da qualidade”. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Pág. 9-11; 24-26; 29-30.

**Damechki, M.; Sotiropoupou, S. e Tsimidou, M.(2001).** “Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils”. Revista: Grasas y Aceites. Vol. 52. Fasc. 3-4, 207-213.Grécia

**Delgadillo, I. (2003).** “Métodos Não Invasivos de Caracterização de Alimentos [Provas de Agregação]”. Universidade de Aveiro. Aveiro.

**Dias, S. (2009).** “Pasta de azeite versus azeite virgem extra”. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Pág. 5-24.

**Eurostat (2005).** “The World of European Olive Oil”.

[http://www.oliveoil.eu/website/product\\_info.php?cust\\_id=&template\\_id=&lang=pt&cPath=&from=sitemap&products\\_id=3](http://www.oliveoil.eu/website/product_info.php?cust_id=&template_id=&lang=pt&cPath=&from=sitemap&products_id=3). 22/Fevereiro/2010.

**Ferraz, V. (2009).** “Processamento Geral dos Alimentos – Processamento do Azeite”. Dissertação de Doutoramento. Instituto Politécnico de Coimbra. Escola Superior Agrária. Coimbra. Pág. 1-6.

**Fiorino, P. (1996).** “Enciclopédia Mundial da Oliveira”. Conselho Oleícola Internacional. Madrid. Pág. 199.

**François, I.; Marien, E.; Brijs, K.; Coppin, P. e Proft, M. (2009).** “The use of Vis/Nir spectroscopy to predict the optimal root harvesting date of chicory (*Cichorium intybus* L.)” *Postharvest Biology and Technology*. 53. Pág. 77-83.

**Garcia-Gonzalez, D.; Tena, N. e Aparício, R. (2007).** “Characterization of olive oil paste volatiles to predict the sensory quality of virgin olive oil”. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109. Pág. 663-672.

**Gonçalves, R. (2009).** “Melhor azeite biológico do mundo é alentejano”. <http://www.hipersuper.pt/2009/03/16/melhor-azeite-biologico-do-mundo-e-alentejano/>. 22/Fevereiro/2010

**Gouveia, J. (1995).** “Azeites virgens do Alto Alentejo – comportamento químico, tecnológico e sensorial”. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

- GPPAA (2007).** “Citridos”. [www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/diagnosticos/subfileiras/Citridos.pdf](http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/diagnosticos/subfileiras/Citridos.pdf). 12/Setembro/2010.
- Grosch, B. (1999).** “Food Chemistry”. Second Edition. Springer. Pág. 195-199.
- Hannacom (2007).** “Especial Olivicultura – Análise de Peróxidos e Acidez no Azeite”. [http://www.hannacom.pt/pdf/hi\\_83730.pdf](http://www.hannacom.pt/pdf/hi_83730.pdf). 21/Fevereiro/2010.
- Hinshaw, J. V. (2003).** “Solid-phase microextraction”. GC connections. LCGC North America. Volume 21. Número 11. Pág. 1056-1061.
- IBT (2009).** “Azeite. ParaVenda”. [http://azeite.paravenda.net/produtos/2066-sabonete\\_vegetal\\_de\\_azeite-juncal\\_caixa\\_de\\_4\\_sabonetes](http://azeite.paravenda.net/produtos/2066-sabonete_vegetal_de_azeite-juncal_caixa_de_4_sabonetes). 23/Fevereiro/2010.
- International Olive Oil Council (1996).** “Organoleptic assessment of virgin olive oil”. RES.COI/T.20/Doc Nº 15/Rev. 5. November.
- Jorge, V. (2009).** “Novo Azeite Virgem Extra Almojanda com Malagueta”. [http://www.hipersuper.pt/2009/10/19novo\\_azeite\\_virgem\\_extra\\_almojanda\\_com\\_malagueta](http://www.hipersuper.pt/2009/10/19novo_azeite_virgem_extra_almojanda_com_malagueta). 27/Fevereiro/2010
- Júnior, M. e Pastore, G. (2007).** “Biotransformação de Limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas.” Revista Química Nova. Vol 30. Nº. 2. Brasil. Pág. 382-387.
- Luchetti, F. (2002).** “Importance and future of olive oil in the world market – An introduction to olive oil”. European Journal of Lipid Science and Technology. Volume 104. Issue 9-10. Pág. 559-563.
- Martins, J. (2005).** “Aplicações da Espectroscopia na Caracterização de Azeites”. Relatório de Projecto. Universidade de Aveiro. Aveiro. Pág. 21-36; 49-55; 65-67.

**Ministério de Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP) (2001).** “Produtos Tradicionais Portugueses”. MADRP. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural. Direcção-Geral de Desenvolvimento Rural. Lisboa. Pág. 20-36.

**Merck (2010).** “Guia para reagentes de Transfecção”. [www.merck-chemicals.com.br/s-limoneno/MDA\\_CHEM-818408/p\\_vk.b.s1LaPcAAAEWEOEfVh](http://www.merck-chemicals.com.br/s-limoneno/MDA_CHEM-818408/p_vk.b.s1LaPcAAAEWEOEfVh) TI. 12/Setembro/2010.

**Morales, M. T.; Luna, G. e Aparício, R. (2005).** “Comparative study of virgin olive oil sensory defects”. Food Chemistry. 91. Pág. 293-301.

**Moreira, J. L.; Marcos, A. M. e Barros, P (2009).** “Potencialidades da espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na análise de vinhos”. Instituto da Vinha e do Vinho. Unidade laboratorial de Gaia – Laboratório Vitivinícola. Pág. 1-8.

**Oliveira, E.; Moura, B. e Coelho, G. (2007).** “Análise de flavor do suco de laranja por microextracção em fase sólida (SPME)”. Revista Analytica. Nº28. Brasil. Pág. 42-50.

**Oliveira, J. E. (2009).** “O que é o azeite”. ADEMO- Associação para o desenvolvimento dos municípios olivícolas.  
[www.ademo.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=27&Itemid=42](http://www.ademo.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=27&Itemid=42).  
20/Novembro/2010.

**Panreac Química (1999).** “Analíticos en Alimentaria – Métodos Oficiales de Analisis – Aceites y grasas”. Panreac Química, S. A. Centre Telemático Editorial. Pág. 12-16.

**Pinto, L. (2003).** “Azeite e Ambiente”.  
[http://cna.pt/artigostecnicos/lucindapinto/19\\_vtagosto2003\\_lucindapinto.pdf](http://cna.pt/artigostecnicos/lucindapinto/19_vtagosto2003_lucindapinto.pdf).  
28/Fevereiro/2010.

**Rastogi, N. K.; Raghavarao, K. S. M. S.; Balasubramaniam, V. M.; Niranjan, K. e Knorr, D. (2007).** “Opportunities and challenges in high pressure processing of foods”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47. Pág. 69-112.

**REGULAMENTO CE 2568/91** de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial das comunidades Europeias*, L 248, p. 1. Consolidada CONSLEG: 1991R2568 – 22/05/2002.

**Ribeiro, L.; Freitas, A.; Gomes da Silva, M. (2008).** “The use of headspace solid phase microextraction for the characterization of volatile compounds in olive oil matrices”. *Talanta*. 77. Pág. 110-117.

**Rodrigues, A. R. (2009).** “Azeite com ouro produzido no Fundão”. <http://www.noticiasdacovilha.pt/pt/artigos/show/scripts/core.htm?p=artigos&f=show&lang=pt&pag=1&area=2&idseccao=9&idartigo=91>. 27/Fevereiro/2010.

**Roque, M.; Carvalho, B.; Teixeira, B.; Fernandes, A. e Cabete, A. (2008).** “Plano HACCP”. <http://www.esac.pt/noronha/IntSegAlim/0708/alunos/HACCP%20azeite.pdf> 13/Maio/2010.

**Santos, M. (2005).** “Utilização da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e quimiometria na identificação do café torrado e moído adulterado”. Tese de Mestrado. Labra – Brazil. Pág. 16.

**Santos, M. (2009).** “ Utilização de alta pressão para aumentar o teor de xanto-humol na cerveja”. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro. Pág. 20-30.

**Sequeira, F. (2009).** “Envelhecimento de Sumos e Refrigerantes. Efeito da embalagem no perfil aromático e teor de ácido ascórbico.” Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. Pág. 16.

**Silva, I. (2007).** “Desenvolvimento de uma metodologia para a análise da composição volátil do sal marinho por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME – GC – MS)”. Universidade de Aveiro. Pág. 9-13.

**Silva, R.; Ribeiro, C.; Borges, M. e Blois, G. (2009).** “Óleo essencial de limão no ensaio da cromatografia em camada delgada”. Química Nova. Volume 32. N.º8. Pág. 2234-2237.

**Tavares, D. M. G. e Farracho, M. C. G. (2009).** “Isolamento e purificação do (+)-limoneno a partir do óleo de laranja”. Relatório – Trabalho 1 – Química Orgânica. Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica. Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.

**Tozetto, A.; Demiate, I. M. e Nagata, N. (2007).** “Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP)”. Ciências e Tecnologia. Alimentar, Campinas. 27 (4). Pág. 723-728.

**Travassos, M. (2009).** “Processamento de Azeite”.

[http://www.esac.pt/noronha/pga/0708/trabalhos/processamneto\\_azeite\\_pga\\_07\\_08.pdf](http://www.esac.pt/noronha/pga/0708/trabalhos/processamneto_azeite_pga_07_08.pdf)  
11/Maio/2010.

**Virost, M.; Tomao, V.; Ginies, C. e Chemat, F. (2008).** “Total lipid extraction of food using d-limonene as an alternative to n-hexane”. Chromatografia. 68. Pág. 311-313.

**Vossen P. (2007).** “International olive council (IOL) and Califórnia trade standards for olive oil”. University of California. Cooperative Extension. Pág. 1-11.

**Wolffenbüttel, A. N. (2007).** “Informativo CRQ – V”. N.º105. Nov./Dez. Pág. 6,7. [www.oleoessencial.com.br](http://www.oleoessencial.com.br). 27/Fevereiro/2010.

**Xi, J. (2006).** “Effect of high pressure processing on the extraction of lycopene in Tomato paste waste.” Chemical Engineering & Technology. 29. 6. Pág. 736-739.

**Yaldagard, M.; Mortazavi, S. A. e Tabatabaie, F. (2008).** “The principles of uktra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects”. African Journal of Biotechnology. 7. 16. Pág. 2739-2767.

**Zhang, S.; Bi, H. e Liu, C. (2007).** “Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure.” Separation and Purification Technology. 57. Pág. 277-282.

**Zhang, S.; Chen, R.; Wu, H. e Wang, C. (2006).** “Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (American Ginseng) root by using ultrahigh pressure.” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41.1. Pág. 57-63.

**Zhang, S.; Liu, C.; Bi, H. e Wang, C. (2008).** “Extraction of flavonóides from *Rhodiola sachlinensis* A. Bor by UPE and the antioxidant activity of its extract.” Natural Product Research. 22:2. Pág. 178-187